

Université de Montréal

Détermination de la contamination microbiologique des litières de fumier recyclé en filière de production bovine en fonction des pratiques de productions et de gestion en élevage

Par

Jessika Beauchemin

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire

en vue de l'obtention du grade de *Maîtrise ès sciences* (M. Sc.)

en sciences vétérinaires, option hygiène vétérinaire et innocuité des aliments

Août 2020

© Jessika Beauchemin, 2020

Université de Montréal

Ce mémoire intitulé

Détermination de la contamination microbiologique des litières de fumier recyclé en filière de production bovine en fonction des pratiques de productions et de gestion en élevage

Présenté par

Jessika Beauchemin

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Julie Arsenault

Présidente-rapporteuse

Philippe Fravallo

Directeur de recherche

Alexandre Thibodeau

Codirecteur

Simon Dufour

Codirecteur

Réjean Lefebvre

Membre du jury

Résumé

La litière de fumier recyclé (LFR) est utilisée dans les fermes canadiennes comme alternative à la litière conventionnelle de paille. Elle est obtenue par l'extraction de la fraction solide du fumier des vaches, parfois suivie par une maturation. Toutefois, les caractéristiques microbiologiques de cette litière sont peu documentées. Ainsi, cette étude a permis la description du microbiote et des caractéristiques microbiologiques de la LFR comparativement à la paille, avant et après leur utilisation, et d'évaluer l'impact de différentes méthodes de production de la LFR sur ces écosystèmes. Les résultats des analyses du microbiote ont démontré que la richesse et la diversité du microbiote de la LFR avant utilisation étaient différentes de celles de la paille. Les litières de fumier recyclé avant et après utilisation possédaient une diversité microbienne moindre comparativement à celles mesurées pour la paille avant et après utilisation. Aussi, les différentes méthodes de production de la LFR n'influençaient pas la richesse du microbiote, mais influencent sa composition. La méthode de production utilisant la séparation suivie d'une maturation en amas possédait une charge bactérienne moindre que celle utilisant la séparation suivie d'une maturation en boîte. Finalement, la LFR contenait plus de *Listeria monocytogenes* et de *Salmonella* spp que la litière de paille. Cela permet de conclure que la LFR, actuellement produite dans les fermes de l'Est du Canada, constitue un risque microbiologique plus élevé que la litière de paille.

Mots-clés : Litière de fumier recyclé (LFR), Paille, Microbiote, Vache laitière, Méthode de production de la litière.

Abstract

Recycled manure solid bedding (RMS) is used on Canadian farms as an alternative to conventional straw bedding. RMS is obtained by extracting the solid fraction of dairy cow manure, sometimes followed by maturation. However, the microbiological characteristics of this bedding are poorly documented. This study allowed the description of the microbiota and microbiological characteristics of RMS compared to straw and assessed the impact of the RMS production methods on its microbiota. The results of the microbiota analyses demonstrated that the richness and diversity of the microbiota in unused RMS were different from unused straw. Unused RMS and used RMS possessed more similar microbial diversity compared to the microbial diversity between unused and used straw. Moreover, the different RMS production methods did not influence the richness of the microbiota but influence its composition. The RMS production method using separation followed by heap maturation had a lower bacterial load than production method using separation followed by box maturation. Finally, RMS contained more *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp than straw bedding. This leads to the conclusion that RMS bedding currently produced on farms in Eastern Canada, clearly constitute a greater microbiological risk as compared to straw bedding.

Keywords: Recycled manure solids (RMS), Straw, Microbiota, Dairy cow, RMS production methods.

Table des matières

Résumé	3
Abstract	4
Table des matières	5
Liste des tableaux	8
Liste des figures	9
Liste des sigles	11
Liste des abréviations	12
Remerciements	15
1 Introduction	17
2 Recensement de la littérature	20
2.1 Production laitière au Québec — État de la situation	21
2.2 Litières conventionnelles.....	22
2.2.1 Importance de la litière.....	22
2.2.2 Types de matériel utilisé comme litière	23
2.2.2.1 La litière de paille.....	25
2.2.2.2 La litière de sable	26
2.2.3 Problématiques liées à la litière traditionnelle	27
2.2.3.1 Contamination microbiologique de la litière.....	27
2.2.3.1.1 Incidence de la mammite sur la santé animale.....	27
2.2.3.1.1.1 Incidence de <i>Salmonella</i> sur la santé animale.....	31
2.2.3.1.1.2 Incidence de <i>Listeria</i> sur la santé animale.....	32
2.2.3.1.2 Incidence sur la santé humaine.....	33
2.2.3.2 Coût d’achat de la litière de paille.....	33

2.3 Litière de fumier recyclé	34
2.3.1 Méthodes de production de la litière de fumier recyclé	35
2.3.1.1 Séparation mécanique	35
2.3.1.1.1 Les séparateurs à tamis	35
2.3.1.1.2 Les séparateurs à pression (vis ou rouleaux).....	36
2.3.1.1.3 Les séparateurs centrifuges	36
2.3.1.2 Maturation	36
2.3.1.2.1 Amas statique et amas retourné.....	37
2.3.1.2.2 Cuve rotative à aération contrôlée.....	38
2.3.1.2.3 Digesteur anaérobique.....	38
2.3.2 Coût de la litière de fumier recyclé	39
2.3.3 Risques associés à l'utilisation de la litière de fumier recyclé	40
2.3.3.1 Risques au niveau de la santé animale	41
2.3.3.2 Risques au niveau de la santé humaine	41
2.3.4 Avantages possibles de la litière de fumier recyclé	42
2.4 Le microbiote des litières	43
2.4.1 Processus d'analyse du microbiote	44
2.4.2 Microbiote de la litière de paille	46
2.4.3 Microbiote gastro-intestinal de la vache	47
2.4.4 Microbiote du fumier	48
2.4.5 Microbiote de la litière de fumier recyclé	49
3 Hypothèse et Objectifs	52
4 Méthodologie et Résultats	55
5 Discussion générale.....	139
5.1 Interprétations des résultats	140

5.2 Limites de l'étude.....	145
5.3 Aspects novateurs.....	146
6 Conclusion et perspectives	148
6.1 Conclusion.....	149
6.2 Perspectives	150
7 Références bibliographiques	151

Liste des tableaux

Table 1. Bedding samples descriptions.....	89
Table 2. Mean, SD and proportion of bedding description.....	93
Table 3. Sequences and OTUs number in positives and negatives controls.....	94
Table 4. Least square means estimated bacterial counts for different groups of bacteria, in unused and used recycled manure solids (RMS) and straw.....	95
Table 5. Least square means estimated bacterial counts (in log CFU/g) for different production groups of bacteria, in unused recycled manure solids (RMS) according to the method used for production.....	96
Table S1: <i>Salmonella</i> confirmation by the Animal Health Laboratory of the Quebec's Ministry of Agriculture.....	97
Table S2. PCR primers used in <i>Listeria monocytogenes</i> detection in bedding samples.....	98
Table S3. List of unique genera in unused recycled manure solids bedding (RMS) or in unused straw.....	99
Table S4. List of unique genera in used recycled manure solids bedding (RMS) or in used straw.....	109
Table S5. List of unique genera in unused or in used straw.....	118
Table S6. List of unique genera in unused or in used RMS.....	126
Table S7. List of unique genera in separation followed with maturation in a heap (S-MH) or in separation with maturation in a box (S-MB) production.....	130

Liste des figures

Figure 1. – General RMS production in Eastern Canadian dairy farm. A fraction of the liquid contained in manure is extracted using a screw or, a roller press. The remaining solid fraction can then be used immediately as bedding, but it will often be further processe using various maturation steps. The final product is then used in stalls. (Figure from: Aida Minguez Menendez.)131

Figure 2. – Phyla repartition in unused Recycled manure solids (A; RMS; n=27) and unused straw (B; n=61) bedding samples. Abundance filter was set to zero and 32 and 31 phyla were obtained for unused RMS and unused straw, respectively.....132

Figure 3. – Genera repartition of unused recycled manure solids (A; RMS; n=27) and unused straw (B; n=61) bedding samples. Abundance filter was set to 0.10 and 15 genera were obtained for unused RMS and 10 genera for unused straw.133

Figure 4. – Microbiota analysis on bedding samples. (A) Observed, Shannon and Inverse Simpson index measures of diversity in used and unused recycled manure solids (RMS) and straw beddings. (B) Non-metric multidimensional scaling plot (NMDS) illustrating microbiota eta diversity according to the bedding type (RMS or straw) and status (used or unused). Each point represents a single bedding sample microbiota based on 107 934 OTUs. Jaccard and Bray-Curtis index were observed and Adonis tests ($p < 0.001$) was performed on Rstudio for statistical analysis.....134

Figure 5. – Phyla repartition in used recycled manure solids (A; RMS; n=27) and used straw (B; n=61) bedding samples. Abundance filter was set to zero and 32 and 29 phyla were obtained for used RMS and used straw beddings, respectively.....135

Figure 6. – Genera repartition in used recycled manure solids (A; RMS; n=27) and unused straw (B; n=61) bedding samples. Abundance filter was set to 0.10 and 9 genera were obtained for used RMS and 16 genera for used straw.

Phyla repartition in unused recycled manure solids (RMS) production. (A) Phyla retrieved from unused RMS bedding obtained from the two main types of RMS production were compared: separation followed with maturation in a heap (S-MH; n=10) and separation with maturation in a box (S-MB; n=11). Abundance filter was set to zero and 28 phyla were obtained. (B) Genera retrieved drum unused RMS bedding obtained from the two main types of RMS production were

compared: separation followed with maturation in a heap (S-MH; n=10) and separation with maturation in a box (S-MB; n=11). The abundance filter was set to 0.10 and 13 genera were obtained.137

Figure 7. – Phyla repartition in unused recycled manure solids (RMS) production. (A) Phyla retrieved from unused RMS bedding obtained from the two main types of RMS production were compared: separation followed with maturation in a heap (S-MH; n=10) and separation with maturation in a box (S-MB; n=11). Abundance filter was set to zero and 28 phyla were obtained. (B) Genera retrieved drum unused RMS bedding obtained from the two main types of RMS production were compared: separation followed with maturation in a heap (S-MH; n=10) and separation with maturation in a box (S-MB; n=11). The abundance filter was set to 0.10 and 13 genera were obtained.137

Figure 8. – Microbiota analysis of unused RMS bedding obtained from the two main types of RMS production: separation followed with maturation in a heap (S-MH; n=10) and separation with maturation in a box (S-MB; n=11). (A) Alpha diversity was measured by Observed, Shannon and InvSimpson index. Statistical comparison was performed using Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$). (B) Non-metric multidimensional scaling plot (NMDS) representing microbiota beta diversity. Each point represents a single unused RMS microbiota associated with one production system and was based on 861 OTUs. Jaccard and Bray-Curtis index were computed and Adonis statistical tests ($p < 0.05$) was performed.138

Liste des sigles

CRIBIQ : Consortium de recherche et innovations en bioprocédés industriels au Québec

CRSV : Chaire de recherche en salubrité des viandes

CRSNG : Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie du Canada

FRQNT : Fonds de recherches du Québec-Nature et technologie

OMS : Organisation mondiale de la santé

NAHMS : Système national de surveillance de la santé animale

Liste des abréviations

°C : Degré Celsius

\$: Dollars

µm : Micromètre

% : Pourcentage

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADONIS: Permutational multivariate analysis of variance using distance matrix

AMOVA: Analysis of MOlecular VAriance

ANOVA: Analysis of variance

ARN 16S : Acide ribonucléique ribosomique de la sous-unité 16

BMD : Bacitracine méthylène disalicylate

\$ CA : Dollars canadien

CCS : Comptage des cellules somatiques

cm : Centimètre

Cna : Protéine de liaison au collagène

CO₂ : Dioxyde de carbone

Fnbp A : Protéine de liaison à la fibronectine A

Fnbp B : Protéine de liaison à la fibronectine B

g : Gramme

h : Heure

HOMOVA : HOmogeneity of MOlecular VAriance

kg : Kilogramme

LFR : Litière de fumier recyclé

ln : Logarithme naturel ou logarithme népérien

Log₁₀ : Logarithme en base 10

m³ : Mètre cube

MaAslin : Multivariate analysis by linear models

mg : Milligramme

min : Minute

ml : Millilitre

mm : Millimètre

NH₃ : Ammoniac

NMDS: Non-metric multidimensional scaling

OTU : Operational taxonomic unit

pb : Paire de bases

PCR : Polymerase chain reaction

pH : Potentiel hydrogène

PIB : Produit intérieur brut

PMS peptides : Phenol-soluble peptides

RMS : Recycled manure solids

UFC : Unité formant une colonie

US\$: Dollars américain

Spa : Protéine A

À tous ceux qui croient en ce qu'ils font

Remerciements

J'aimerais remercier mon directeur Dr Philippe Fravallo pour m'avoir donné l'opportunité et le privilège de travailler sous sa direction et de m'avoir fait confiance pour réaliser ce projet de maîtrise. J'aimerais aussi remercier mes codirecteurs Dr Simon Dufour et Dr Alexandre Thibodeau pour leurs conseils, supports et aides tout au long du projet et de la rédaction de ce mémoire. J'aimerais également remercier tous mes collègues de la Chaire de recherche en salubrité des viandes, qui sont devenues des amis précieux, pour leur aide, leur soutien, leur conseil et leurs moments de folie qui m'ont permis de réaliser cette aventure. J'aimerais également remercier les organismes subventionnaires de ce projet soit la Chaire de recherche en salubrité des viandes (CRSV), le Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG), le Fonds de recherches du Québec-Nature et technologie (FRQNT), le Consortium de recherche et innovations en bioprocédés industriels au Québec (CRIBIQ) ainsi que Novalait Inc. qui ont permis la réalisation de ce projet. J'aimerais également remercier l'équipe de Recherche de Op+Lait pour la création de ce projet. J'aimerais remercier Annie Fréchette et Caroline Forest pour l'échantillonnage des nombreuses fermes. J'aimerais remercier, William Thériault, pour son aide précieuse à l'élaboration de la méthodologie des expériences et pour son aide tout au long du projet. J'aimerais remercier, tout spécialement, Charlotte Braley, pour son aide, son soutien, pour nos nombreux moments de rire et de chocolat chaud et pour ces connaissances de bio-informatique exceptionnelles. Finalement, j'aimerais remercier mes parents (Mireille et Michel), mon frère (Yannick) ainsi que mon conjoint (Mathieu) pour leur support, leurs encouragements et leur patience tout au long de mon parcours de maîtrise universitaire, car je dois leur en avoir fait voir de toutes les couleurs.

1 Introduction

La production laitière est une industrie importante au Québec puisqu'elle représente 28% des recettes agricoles soit 2,7 milliards de \$ CA (1). Plusieurs nouvelles innovations se sont développées récemment afin d'améliorer la gestion et la rentabilité des troupeaux laitiers, dont la mise en place de moniteurs d'activités des vaches, de systèmes de traites automatisées et de systèmes d'alimentation automatisés pour ne nommer que celles-là (2, 3). Une des dernières innovations touche la litière des animaux. Actuellement, la litière de paille est le type de litière qui est le plus utilisé, mais cette litière peut contenir des bactéries pathogènes qui peuvent causer des mammites entraînant d'importantes pertes économiques pour les producteurs laitiers (4-7). Ces mammites sont principalement causées par les streptocoques, les staphylocoques et les coliformes (8, 9). De plus, les producteurs recherchent des alternatives à la litière de paille puisque son coût annuel d'achat peut atteindre 542 \$ CA par vache (10).

Un intérêt croissant pour la litière de fumier recyclé (LFR) s'est donc développé auprès des producteurs de lait du Canada. La litière de fumier recyclé, produite à partir d'une séparation solide-liquide du fumier récolté dans la ferme, est constituée des fibres végétales non digérées par la vache. À la suite de cette extraction d'une partie du liquide, une étape de maturation de la fraction restante peut survenir. Elle peut être effectuée par plusieurs méthodes, dont une maturation en amas, en boîte, dans une cuve rotative à aération contrôlée ou encore à l'aide d'un digesteur anaérobie (11-13). L'attrait des producteurs pour ce type de litière est dû à son accessibilité : elle est produite en grande quantité sur la ferme, le fumier y étant une ressource plus qu'abondante (10). La litière de fumier recyclé est utilisée depuis plusieurs années aux États-Unis et plusieurs bénéfices ont été associés à l'emploi de cette litière dont l'augmentation du confort, la réduction des lésions du jarret ou encore l'amélioration de la propreté des vaches comparativement à d'autres litières conventionnelles comme la paille (14, 15). Or, plusieurs autres études ont indiqué que la LFR pouvait contenir une plus grande concentration de bactéries pathogènes telle que *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp. et *Staphylococcus* spp. (16, 17). Toutefois, ces études se sont déroulées principalement aux États-Unis et très peu de données sont disponibles dans la littérature sur l'utilisation de cette litière dans les conditions de l'Est du Canada, plus particulièrement au Québec.

Ainsi, l'étude de ce mémoire fait partie d'une étude plus large qui vise à décrire l'impact de l'utilisation de la litière de fumier recyclé sur la santé et le bien-être des animaux, la santé

humaine et la qualité du lait. Dans ce mémoire de maîtrise, l'objectif sera de décrire les différentes caractéristiques microbiologiques de la litière de fumier recyclé en comparaison avec la litière conventionnelle de paille, et de déterminer l'impact de l'utilisation des litières sur leur microbiote. En objectif complémentaire, cette étude déterminera l'influence de différents types de productions de la LFR sur son microbiote.

2 Recensement de la littérature

2.1 Production laitière au Québec — État de la situation

Le Québec est la principale province productrice de lait au Canada. En effet, 36 % des recettes provenant de la production laitière canadienne découlent du Québec permettant à la province de figurer au premier rang au Canada tant pour le volume de production de lait que pour le nombre de fermes engagées dans ce type de production (1). Ce sont près de 4 900 fermes laitières, pour un total de 356 100 vaches laitières, réparties sur l'ensemble du territoire québécois, qui mettent en marché près de 3,33 milliards de litres de lait par année (18). Cela correspond à un revenu de 2,7 milliards de dollars correspondant à 28 % de l'ensemble des recettes agricoles au Québec (1). La production laitière québécoise a généré 6,2 milliards de dollars en contribution au produit intérieur brut (PIB) au cours de l'année 2019 (1). Les fermes laitières québécoises possèdent en moyenne un troupeau de 70 vaches produisant près de 600 000 litres de lait par année, alors qu'au Canada, la taille du troupeau moyen est de 92 vaches (19).

L'environnement de la ferme a une incidence directe sur le bien-être et la santé des vaches laitières et donc sur la productivité de celles-ci, et impacte donc directement la santé financière de la ferme (20). Parmi les paramètres environnementaux impactant, peuvent être cités : le type de litière utilisé, la quantité utilisée ou encore le type de stabulation. En effet, plusieurs types de litières, de types de logettes ou encore de types de stabulation peuvent être utilisés selon la réalité et la préférence de chaque producteur (21). Des blessures, des problèmes aux pattes, des maladies comme la mammite ou encore des troubles métaboliques, comme la cétose soit l'accumulation de corps cétoniques dans le sang, peuvent survenir si une gestion des logettes n'est pas adéquate (22). Ces blessures et maladies peuvent influencer l'état de santé des vaches et leurs comportements permettant ainsi d'évaluer le bien-être de celles-ci (21).

2.2 Litières conventionnelles

2.2.1 Importance de la litière

Un repos quotidien adéquat et un environnement confortable sont essentiels pour le bien-être des vaches laitières puisqu'il permet d'éviter un stress à l'animal (23, 24). En effet, les vaches laitières passent une grande partie de leur journée couchée dans leur logette. Elles restent en moyenne près de 50 % de leur temps couchées soit environ 12 heures par jour (25). Ainsi, un temps moindre de repos peut signifier un problème de confort.

Plusieurs indicateurs permettent d'identifier un problème de confort. Ce sont la présence de blessures, des levers et couchers moins fréquents (normalement 10 à 15 fois par jour), des comportements anormaux et des boiteries. La principale cause de ces inconforts est une surface de logette trop dure, due à une trop faible quantité de litière ou à un recouvrement partiel du sol de la logette par la litière entraînant un inconfort chronique pour la vache (26, 27). Selon les résultats d'une étude de Tucker et Weary (2004), plus la quantité de litière utilisée dans les logettes est importante, plus le temps de repos et la fréquence des levers et couchers augmentent. Dans cette étude, le temps moyen de repos passait de 12,3 h avec un écart type de 0,53 h sur un matelas exempt de litière ($12,3 \pm 0,53$ h) à un temps moyen de $13,8 \pm 0,53$ h sur une litière de sable de 7,5 kg par logette (28).

D'autres études ont également précisé l'apport de ce meilleur bien-être sur la production de lait et la réduction des boiteries (29-31). Les litières permettent également d'absorber et de retenir l'urine, de diminuer l'humidité sous la vache, de diminuer la friction, d'apporter une bonne traction et d'améliorer la mollesse de la surface de la logette pour un temps de repos augmenté (10, 21). Ainsi, les différents types de litière visent à assurer le confort ainsi que la propreté des vaches.

En résumé, une bonne litière doit pouvoir procurer un confort et permettre l'expression de comportements naturels propres à l'espèce. De plus, l'utilisation d'une quantité adéquate de litière sèche permet de favoriser le temps de repos et de limiter les risques de blessures comme les boiteries ou encore les lésions. Les conditions attendues sont donc des surfaces des logettes souples, antidérapantes, non abrasives et sèches (21).

2.2.2 Types de matériel utilisé comme litière

Plusieurs types de litière sont utilisés dans les fermes québécoises et sont classés en deux groupes principaux soit les litières organiques et les litières inorganiques (32). La litière organique est principalement représentée par la paille de céréales ou les produits de bois comme la sciure ou les copeaux. La litière de fumier recyclé entre dans cette catégorie. Il est aussi possible de retrouver, plus marginalement, des résidus de culture comme le lin, le maïs, le soja ou le canola (27). La litière inorganique est uniquement représentée par le sable (32). Les différents types de litières sont sélectionnés par les producteurs selon plusieurs caractéristiques qui sont principalement la disponibilité et le coût de ces supports. La capacité d'absorption des liquides, le confort apporté et la capacité isolante sont d'autres caractéristiques importantes, comme l'est la praticité de l'utilisation : le niveau de poussière généré, la capacité de recouvrement de la logette, la compatibilité avec l'équipement de manutention du fumier lequel peut varier selon le type de stabulation utilisée. Enfin, quel que soit le type de litière envisagé, le taux de contaminants microbiologiques, pouvant affecter la santé des animaux, doit être au minimum (10, 27).

Pour ce dernier point, il faut également garder en tête que la litière peut supporter la croissance de bactéries, croissance modulée par divers facteurs comme la température, l'humidité, la gestion de la litière et la présence adéquate de nutriments (17). Ainsi, les saisons et les différents climats peuvent avoir une incidence sur l'ensemble des populations de bactéries retrouvées dans la litière, appelé microbiote bactérien, dont certains membres sont des agents pathogènes causant des mammites. Par exemple, les streptocoques et les coliformes ont une plus grande croissance à des températures chaudes et des taux d'humidité élevés (17, 33). De plus, certains de ces microorganismes peuvent être des agents pathogènes non seulement pour la vache, mais aussi pour l'humain. Assez logiquement, la litière la plus contaminée se retrouve dans le tiers arrière des logettes : l'urine, le fumier et d'autres sources de matière organique concourant à y maintenir une forte densité bactérienne (17, 34).

La taille des particules de la litière a également un impact sur le microbiote de la litière organique. Des particules de petites tailles supportent une population bactérienne plus élevée que la même litière présentant des particules plus grandes (17, 33). Un bon exemple pour illustrer ce point est la litière de paille: coupée finement (hachée) elle possède une plus grande surface pour que les bactéries adhèrent, se fixent et colonisent comparativement à une litière de paille non

coupée. De plus, les particules de litière organique plus petites se fixent plus facilement aux trayons de la vache ce qui augmente l'exposition de l'extrémité du trayon aux agents pathogènes responsables de la mammites (33).

La paille est le type de litière le plus utilisé actuellement, mais tout comme les autres litières organiques, elle peut être un important réservoir de plusieurs bactéries pathogènes (4-6). En effet, la paille contient plusieurs éléments qui sont nécessaires pour la croissance de microorganismes, dont un pH adéquat, et un pourcentage de carbone élevé (6). Ces paramètres peuvent influencer favorablement la croissance de certaines bactéries pathogènes comme c'est le cas pour *Klebsiella pneumoniae* (6).

La litière de sable apparaît quant à elle un choix populaire et elle est recommandée puisqu'elle apporte un bon confort et présente généralement un dénombrement bactérien plus bas que les litières organiques et ne favorise pas intrinsèquement la croissance bactérienne (17, 35, 36). Contrairement aux litières organiques, les petites particules de sables ne supportent pas une population bactérienne plus grande que des particules de sables plus grosses. La litière de sable doit être composée de particules avec une taille uniforme. Des particules de taille uniforme permettent un drainage approprié de l'urine et de l'humidité (31). Cependant, cette litière peut soutenir la croissance de microorganismes lorsqu'elle est en contact avec des matières fécales ou l'urine des vaches laitières (37). De plus, un inconvénient de la litière inorganique est sa propriété abrasive sur l'équipement dans la ferme, et comme le mentionne une étude de Hudsfield et al. (2011), toutes les fermes n'ont pas accès à ce type de litière ni ne possèdent l'équipement ou l'espace pour un entreposage adéquat (38). Le fumier chargé de sable est plus lourd et plus sec entraînant une accélération de l'usure de l'équipement de manutention. La collecte du fumier chargé de sable peut s'effectuer par plusieurs méthodes comme l'utilisation d'un tracteur, d'un racleur automatique ou d'une chasse hydraulique. Le système le plus simple peut coûter entre 3000 à 6000 dollars canadiens. Le fumier peut aussi être acheminé vers une structure d'entreposage à long terme afin de séparer le sable des fèces. Cette séparation permet de réduire l'usure de l'équipement de manutention et permet de récupérer le sable pour le réutiliser comme litière. Le processus de séparation s'effectue à l'aide de bassins de déversement et de décantation ou encore à l'aide d'équipements mécaniques. Les stratégies d'entreposage à long terme demandent une grande superficie à la ferme (39, 40).

Les litières organiques autant que les litières inorganiques peuvent donc exposer les glandes mammaires de la vache aux agents pathogènes environnementaux, comme les *Streptococcus*, les coliformes ou encore les *Staphylococcus* (6). Une corrélation positive existe entre les dénombrements bactériens des litières et ceux des glandes mammaires de la vache (6, 32). Ce paramètre est à considérer dans l'analyse des avantages et des inconvénients précédant le choix d'un type de litière. Cette analyse sera détaillée dans les sections suivantes pour les principaux types de litières.

2.2.2.1 La litière de paille

La litière de paille est une litière organique et est le type de litière la plus utilisée par les producteurs laitiers (4). Cette litière procure aux vaches laitières un support d'une bonne souplesse et une isolation thermique permettant d'assurer leur confort (41). L'une des raisons de son utilisation est que ce type de litière est compatible avec la plupart des systèmes d'entreposage des fermes. De plus, les vaches laitières semblent préférer ce type de litière comparativement à la litière inorganique de sable. Des études ont établi que face à un choix, les vaches privilégient de s'étendre sur la litière de paille comparativement à la litière de sable et que le temps de repos se révèle plus long sur la paille (749 ± 16 min) que sur le sable (678 ± 19 min) (42, 43). Le pourcentage de matière sèche de la paille propre est de 88 %, du même ordre que celui des produits de bois (85%) et de la litière de sable (92%). Cependant, une fois la litière de paille ou de bois utilisée, son taux de matière sèche diminue (78 % et 75% respectivement) comparativement au 95 % présenté par le sable (5). Le faible pourcentage de matière sèche de la litière de paille utilisée peut s'expliquer par le fait que la paille possède un facteur d'absorption élevé. Ce facteur est de 2,1 pour la paille comparativement à 0,3 pour la litière inorganique (sable) (44). Ainsi, la paille permet de retenir l'humidité des fèces et de l'urine, mais cela augmente le risque de croissance bactérienne. Cette dernière est observée dans les 6 à 24 heures suivant l'introduction de la litière dans les logettes (45).

De ce fait, une plus grande concentration bactérienne, notamment de *Streptococcus* spp. et de coliformes, est retrouvée dans la paille inutilisée comparativement aux litières inorganiques. De même une plus grande population de *Klebsiella* spp., et plus généralement de bactéries à Gram négatif, est présente dans les litières de paille inutilisée comparativement aux litières à base de produits de bois (5, 32). En effet, $11,7 \pm 0,6$ ln UFC/ml (de suspension liquide de litière) de *Klebsiella* spp. ont été détectés dans la litière de paille inutilisée contrairement à $4,3 \pm 0,9$ ln UFC/ml

pour les produits de bois inutilisés. Au niveau des bactéries Gram négatif, il a été dénombré $12,9 \pm 0,53$ ln UFC/ml pour la paille inutilisée comparativement à $5,0 \pm 0,76$ ln UFC/ml pour la litière de produits de bois inutilisés (5). Par ailleurs, les populations bactériennes varient selon les saisons. En effet, les bactéries à Gram négatif sont retrouvées en plus grande quantité dans la paille (inutilisée et utilisée) durant l'été et l'automne et plus spécifiquement les coliformes ont une plus grande concentration durant l'été que durant l'hiver. Or, aucune différence n'a été observée pour *Klebsiella* (45).

Les grandes quantités de poussières et de bioaérosols (comme le β (1-3)-glucan) sont un autre paramètre à considérer lors du choix de l'utilisation de la litière de paille. Ces bioaérosols peuvent causer des problèmes de santé au niveau respiratoire (46).

2.2.2.2 La litière de sable

La litière de sable est une litière inorganique et l'un des types de litières les plus utilisés. Le sable possède plusieurs qualités naturelles permettant un bon confort à la vache. De plus, cette litière limite la croissance bactérienne par son caractère inorganique. Également, le sable permet de réduire le stress thermique lié à la chaleur grâce à une température qui reste plus basse que les autres types de litière. Cette litière possède une faible teneur en humidité initiale et le sable est non absorbant ce qui permet de ne pas retenir l'urine et l'humidité comparativement aux litières organiques comme la paille, permettant une réduction de l'accumulation de l'humidité sous la vache. Lors de l'utilisation, la couche supérieure de sable sèche rapidement ce qui limite la croissance et la capacité de survie des bactéries (31). Finalement, elle réduit les risques de glissements puisqu'elle augmente la traction (20, 47).

Le confort que procure le sable peut être aussi expliqué par les caractéristiques physiques du sable. La grosseur (0.1-1 mm) et l'uniformité des particules de sable permettent de soutenir et de distribuer le poids de la vache sur la zone de la logette autant en position couchée qu'en position debout. Selon une étude de Stowell et Inglis (2000), le sable est une matière non cohésive qui sous pression atténue l'impact des points de contact de la vache et réduit les lésions du jarret (47).

Cependant, lorsque le sable est en contact avec des matières organiques comme les fèces et l'urine, il y aura tout de même croissance de bactéries comme avec les autres types de litières. Mais le risque environnemental de mammites est réduit comparativement aux litières organiques comme la paille (31). Ainsi, plusieurs études ont évalué la charge bactérienne contenue dans la litière de

sable (inutilisée et utilisée) (6, 16). Il apparaît que le sable contient 100 fois moins de bactéries pathogènes (33) pouvant causer la mammite par gramme de litière que les litières organiques comme la paille et la sciure de bois (8).

Toutefois, une grande quantité de sable est requise par vache par jour. Ainsi, une logette utilisant le sable doit avoir une épaisseur entre 15 à 25 cm de sable pour offrir un bon confort aux vaches. De plus, un ajout de litière doit être fait tous les 12 à 14 jours (31). Le sable comporte quelques autres désavantages comme sa capacité abrasive sur l'équipement de la ferme, sa manipulation qui est plus fastidieuse puisque le sable est lourd (20). Aussi, la gestion de la matière souillée provenant du sable est difficile.

2.2.3 Problématiques liées à la litière traditionnelle

L'utilisation des litières organiques et inorganiques traditionnelles (paille, sciure de bois, sable, etc.) est associée à certaines problématiques comme la présence de bactéries pathogènes pouvant avoir un impact sur la santé animale et la santé humaine ou encore un coût élevé.

2.2.3.1 Contamination microbiologique de la litière

2.2.3.1.1 Incidence de la mammite sur la santé animale

Puisque les vaches peuvent passer près de 12 h couchées sur la litière tout au long de la journée, les trayons de celles-ci vont être en contact direct avec les bactéries présentes dans la litière (28). Ainsi, la santé animale peut être impactée par diverses bactéries pathogènes se retrouvant dans la litière. Parmi les maladies induites, on retrouve notamment les mammites.

La mammite est la maladie qui affecte le plus l'économie de l'industrie laitière. Les pertes économiques s'élèvent jusqu'à plus de 2 milliards US\$ par année aux États-Unis et jusqu'à 666 millions \$ CA par année au Canada (7, 48). Ces pertes économiques sont dues aux coûts de traitements, à la mortalité, la perte de la fertilité des vaches, mais principalement à la diminution de la production de lait qui représente à lui seul 70 à 80% des pertes économiques (49). En effet, l'infection d'un seul quartier de la glande mammaire de la vache peut réduire la production de 10 à 12% par vache (48).

Plus précisément, la mammite bovine est une inflammation d'un ou de plusieurs quartiers de la mamelle. Elle est causée majoritairement par les bactéries (99%), mais elle peut aussi être

causée par des levures ou encore des algues (49, 50). La mammite est classée selon l'importance de la réaction inflammatoire (clinique ou subclinique). Trois grades sont observés au niveau de la mammite clinique permettant de classer les mammites de bénignes à sévères. Le changement de l'apparence du lait est observé lors du premier grade. Lors du deuxième grade, des signes classiques de réactions inflammatoires (glande mammaire gonflée et dure et augmentation de la température) du quartier affecté sont observés. Au troisième grade, il y a dégradation de l'état de santé de la vache puisqu'il s'agit d'une réaction systémique : les mammites de grade trois peuvent mener à la mort (9). Lorsqu'une vache est atteinte d'une mammite subclinique, le comptage des cellules somatiques (leucocytes, neutrophiles, et les cellules épithéliales) augmente et une diminution de la production du lait est observée (9, 51). De plus, les mammites peuvent aussi être classées comme mammites contagieuses ou comme mammite environnementale. Les mammites contagieuses sont causées par des agents pathogènes se transmettant d'un animal à l'autre lors de la traite. Les mammites environnementales sont causées par des bactéries opportunistes présentes dans l'environnement. Ces bactéries résident dans le tube digestif, la peau, le sol et la litière (49, 51). En effet, la majorité des bactéries pathogènes qui causent la mammite possèdent la capacité de survivre dans le tube digestif de la vache et de se reproduire dans le fumier de celle-ci.

Les cas des mammites cliniques ont été associés à la nature et la taille de la population bactérienne retrouvée sur les trayons de la vache. Cette population bactérienne des trayons est statistiquement associée à celle contenue dans les litières (52, 53). Les mammites sont principalement causées par les streptocoques, les staphylocoques et les coliformes, dont *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* (8, 9).

Les streptocoques sont des cocci (en paire ou en chaîne) à Gram positif non mobile et à catalase négative. Ils ne produisent pas de spores. La plupart des streptocoques sont anaérobies facultatifs, mais certains sont des anaérobies obligatoires. Les streptocoques sont classés en fonction de la morphologie des colonies, de leurs réactions biochimiques et de leur spécificité sérologique. Le groupement sérologique, basé sur les différences antigéniques, permet de distribuer les streptocoques dans des groupes de A à V. Les souches du groupe B (*Streptococcus agalactiae*) ne possèdent pas de facteurs de virulence définis (54). Les mammites causées par les streptocoques (*Streptococcus agalactiae*) sont des mammites qui répondent bien aux antibiotiques et qui possèdent un bon taux de guérison (75-85%). *Streptococcus agalactiae* ne survit pas dans

l'environnement et le quartier infecté est la source principale de ces bactéries. La transmission de cette bactérie se fait durant la traite et passe d'une vache à une autre par l'équipement qui est contaminé ou par l'utilisation d'une seule serviette, qui est partagée, lors de la préparation des vaches pour la traite (50, 55).

Dans le même genre, deux espèces, *Streptococcus uberis* et *Streptococcus dysgalactiae*, présentent un profil de bactéries à réservoir environnemental. Les mammites à Streptocoques peuvent être évitées si les principes de base recommandés par la National Mastitis Council (NMC) sont respectés. Ces principes sont : maintenir un environnement sec et propre, respecter une hygiène sans compromis lors de la préparation à la traite, appliquer systématiquement et de manière adéquate la désinfection des trayons après la traite et utiliser un scellant à trayon pour toutes les vaches lors du tarissement (50).

Les staphylocoques sont des cocci de 1 µm de diamètre et ce sont des bactéries à Gram positif et anaérobies facultatives. Toutes les bactéries du genre *Staphylococcus* sont négatives au test catalase sauf exception: *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus intermedius*. *S. aureus* exprime plusieurs facteurs de virulence comme des protéines de surface (la protéine A (Spa), protéines de liaison à la fibronectine A et B (Fnbp A et Fnbp B), protéine de liaison au collagène (Cna), etc.) qui favorisent la colonisation du tissu de l'hôte ou encore des toxines ayant la capacité de faire des pores dans la membrane cellulaire (delta-hémolysine, PMS peptides, leucotoxines, etc.) (56, 57). D'autres facteurs de virulence inhibent la phagocytose.

Staphylococcus aureus est responsable de la plupart des cas de mammites contagieuses chez les bovins laitiers. Elle cause majoritairement des mammites subcliniques, mais les quartiers infectés peuvent également subir des épisodes de mammites cliniques qui sont récurrentes. Le taux de guérison dans ce cas est de 40%. Cependant, l'élimination de *Staphylococcus aureus* de la glande mammaire n'est pratiquement pas possible à long terme. Cette bactérie produit des toxines qui endommagent les tissus de l'hôte et causent la formation de microabcès ce qui réduit la production de lait et la probabilité de guérison (efficacité du traitement) (58). De plus, certaines souches de *S. aureus* peuvent produire des enzymes (β -lactamase) qui inactivent la plupart des antibiotiques disponibles pour traiter les mammites (58). Ainsi, les *Staphylococcus aureus* sont fréquemment résistants à la pénicilline. C'est le quartier infecté de la vache qui est la source

principale de la contamination des congénères, généralement lors de la traite par le biais d'un équipement contaminé (50, 59, 60).

Les Staphylocoques non-aureus est un groupe hétérogène qui comprend plus de 50 espèces et sous-espèces identifiées dont 20 sont fréquemment retrouvées dans le lait (61, 62). Cette bactérie est l'une des principales causes de mammites subcliniques dans les troupeaux laitiers qui ont contrôlé les agents pathogènes majeurs de la mammite (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*). La virulence et le profil de résistance et leur impact sur la santé de la glande mammaire et de la production de lait sont variables (63, 64). Par exemple, *S. chromogenes* semble être adapté à l'hôte alors que *S. haemolyticus* agit comme une bactérie opportuniste (65). Certaines espèces, appartenant au groupe des staphylocoques non-aureus, se retrouvent dans l'environnement de la vache (mamelle, logette, litière) ce qui peut entraîner à une réinfection de la vache (66).

Les coliformes appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*. Les *Enterobacteriaceae* sont majoritairement anaérobies facultatifs et leur taille est entre 0,3 et 1,0 µm de largeur et 0,6 à 6,0 µm de longueur (67). *Escherichia coli* et les espèces du genre *Klebsiella* font partie de cette famille bactérienne. Les *Klebsiella* sont des bactéries à Gram négatif en forme de bâtonnet, non motiles et qui sont généralement encapsulées. *Escherichia coli* est un bacille à Gram négatif qui ne forme pas de spores et est habituellement motile (67, 68). Les mammites dues aux coliformes (*Klebsiella* et *Escherichia coli*) sont majoritairement d'origine environnementale et causent des mammites cliniques d'intensité modérée à sévère. Ces bactéries se retrouvent partout dans l'environnement de la vache, notamment dans la litière. L'incidence des mammites est plus importante lors de la période de tarissement que durant la période de lactation. De plus, les saisons influencent l'apparition de nouveaux cas de mammites. En effet, les périodes chaudes et humides sont propices à la croissance des coliformes dans la litière favorisant une plus grande fréquence d'infections. De plus, l'âge des vaches influence la prévalence des mammites à coliformes et les vieilles vaches sont plus susceptibles de contracter une mammite que les plus jeunes (50).

Comme mentionné ci-dessus, la contamination par ces bactéries peut s'effectuer directement à partir de l'environnement (fumier, litière, sol) et la période la plus à risque se situe au début du tarissement (2-3 sem.) et autour du vêlage. Les mammites dues aux coliformes se traduisent par des cas cliniques dans 80 à 90% des cas, situation légèrement supérieure à celle des

mammites à streptocoques (50, 69). Ainsi, de bonnes gestions de l'environnement, de l'équipement et du fumier sont cruciales afin de réduire l'exposition des trayons de la vache aux bactéries pathogènes causant la mammite (17).

2.2.3.1.1.1 Incidence de *Salmonella* sur la santé animale

Les vaches laitières peuvent aussi être atteintes de la salmonellose. La salmonellose est une infection causée par la bactérie *Salmonella*. La bactérie *Salmonella*, un bacille à Gram négatif et anaérobie facultatif de la famille des *Enterobacteriaceae*, est considérée en production bovine comme une bactérie pathogène opportuniste (70). Le genre *Salmonella* possède deux espèces soit *S. enterica* et *S. bongori*. *Salmonella enterica* peut être divisée en six sous-espèces et c'est la sous-espèce *S. enterica enterica* qui possède un plus grand intérêt chez les bovins, car elle est la seule associée à des problématiques de santé. De plus, 2500 sérotypes, basés sur les antigènes somatiques (O, définissant le sérotype), flagellaires (H) et capsulaires (Vi), sont répertoriés. Les isolats bovins cliniques sont principalement retrouvés dans les sérogroupes B, C et E. Ces sérogroupes ne sont pas spécifiques à l'hôte. Des problèmes de santé majeurs sont cependant associés au sérotype Dublin (sérotype D) qui est adapté à l'hôte chez les bovins (71, 72). La salmonellose, qui est causée par les bactéries *Salmonella* sp., peut causer chez les bovins de la fièvre, des diarrhées sanguinolentes, des coliques, des avortements ou encore des pneumonies chez les veaux (73). *Salmonella* Dublin peut causer chez la vache des diarrhées sanguinolentes ou aqueuses, de la fièvre, de l'abattement, la perte d'appétit, l'avortement et la diminution de la production laitière. Elle peut aussi affecter les veaux en causant là encore des diarrhées sanguinolentes ou aqueuses, de la fièvre, l'abattement, la perte d'appétit en plus de, problèmes respiratoires ou de mortalité subite (74). *Salmonella* se retrouve principalement dans les fèces des animaux et peut être détectée dans les sécrétions comme le lait, la salive et l'urine. Elle se transmet principalement par la voie fécale orale par plusieurs intermédiaires, dont la nourriture et l'environnement contaminé. Elle peut être introduite dans un troupeau par l'arrivée d'une vache infectée, par l'équipement contaminé ou par des visiteurs. Elle peut être transmise à l'humain principalement par la voie alimentaire (*p.ex.* consommation de lait non pasteurisé), mais aussi à la suite d'un contact direct ou indirect avec des animaux contaminés ou indirectement par la litière ou encore de l'équipement contaminé (74, 75). Le Système national de surveillance de la santé animale (NAHMS) du département de l'agriculture des États-Unis rapporte qu'en 2007 qu'environ 40% des fermes laitières comptaient au moins une vache positive à *Salmonella*. De plus, sur les quelque 3800 vaches dites en bonne santé analysées,

l'étude décrit qu'environ 14% étaient positives par la culture fécale (76). Aussi, selon cette même étude, les sérotypes les plus fréquemment isolés étaient : *Salmonella* Cerro, *Salmonella* Kentucky, *Salmonella* Montevideo et *Salmonella* Muenster. Selon une autre étude réalisée en 2009, le sérotype prédominant était *Salmonella* Newport (41%) suivi de *Salmonella* Typhimurium (20%) (77). Mais, le sérotype le plus souvent détecté dans les cas soumis au National Veterinary Services laboratory (NVSL) aux États-Unis est *Salmonella* Dublin (18%) (71).

2.2.3.1.1.2 Incidence de *Listeria* sur la santé animale

Les vaches laitières peuvent aussi contracter la listériose. La listériose est une maladie pouvant toucher autant les animaux que les humains. Elle est causée par la bactérie pathogène *Listeria* (*Listeria monocytogenes* et *Listeria ivanovii*). Les *Listeria* sont des bactéries de type coccobacilles motiles à Gram positif anaérobie facultatives (78, 79). Cette bactérie pathogène est classée en quatre lignées génétiques (I-IV) et elle possède 13 sérotypes basés sur les antigènes somatiques et flagellaires (80, 81). Les lignées III et IV sont rarement responsables de cas chez l'humain, mais elles sont fréquemment impliquées dans des cas chez les animaux pouvant même entraîner quelques éclosions souvent liées à une contamination de l'ensilage (82, 83). C'est une bactérie qui est présente dans différents environnements incluant le sol et les fèces et qui persiste dans des conditions défavorables pour d'autres bactéries. En effet, elle peut survivre à des températures de réfrigération et sur une large gamme de pH (84, 85). Selon une étude de 2007 réalisée en Galice (au nord de l'Espagne), 16,3% des échantillons de lait et 32,2% des échantillons de fèces étaient contaminés par *Listeria* spp. De plus, l'espèce *Listeria monocytogenes*, danger zoonotique avéré, a été détectée dans des échantillons de lait cru (6,1%), d'échantillons fécaux (9,3%) et dans des échantillons d'ensilage (6%) (86). La listériose se manifeste chez les ruminants sous la forme d'encéphalites, de mortalité néonatale et de septicémie. La forme clinique la plus retrouvée chez les bovins est l'encéphalite et seuls de petits groupes sont affectés (8 à 10% du troupeau). Les animaux les plus sensibles à *Listeria monocytogenes* sont ceux présentant une diminution de l'immunité et le taux de mortalité, lors d'une infection, est alors de l'ordre de 20%, mais peut atteindre 100% (87, 88).

2.2.3.1.2 Incidence sur la santé humaine

Certaines bactéries pathogènes évoquées en production laitière, comme les *Salmonella* et les *Listeria monocytogenes*, présentent un caractère zoonotique. Ces bactéries pathogènes ont une grande importance en santé publique due à la gravité des cas cliniques qu'elles peuvent engendrer et à la résistance de certaines souches. Les symptômes possibles associés à la listériose sont des nausées, des vomissements, des crampes, des diarrhées ou constipations, des maux de tête et de la fièvre. Mais, chez les personnes ayant un système immunitaire affaibli, les femmes enceintes et les jeunes enfants, les signes cliniques sont plus graves : comme des septicémies ou encore des encéphalites (89). Les symptômes liés à la salmonellose apparaissent dans les 6 à 72 h suivant le contact et la durée de la maladie est habituellement de 2 à 7 jours. Les symptômes sont principalement des diarrhées, des crampes abdominales, de la fièvre, des maux de tête, des nausées ou des vomissements. Or, chez les personnes ayant un système immunitaire affaibli, les signes cliniques peuvent se compliquer et inclure une septicémie ou encore des déshydratations pouvant être sévères (73). Comme *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. peut être transmise à l'humain par des contacts directs ou indirects avec un animal infecté (90). Mais pour ces deux dangers, la principale voie de contamination de l'humain est bien alimentaire et le lait et les produits laitiers sont des vecteurs bien documentés d'exposition des consommateurs.

Ainsi, la santé humaine peut aussi être impactée par les bactéries pathogènes retrouvées dans la litière si les mesures de gestions et de protections ne sont pas appliquées adéquatement. Ainsi, selon le Code sanitaire pour les animaux terrestres, il est recommandé d'appliquer les mesures de gestions adéquates pour les matières fécales contaminées et d'appliquer les procédures de contrôle de l'hygiène des employés et du nettoyage et désinfection des équipements à la suite de la manipulation des matières contaminées comme la litière (91).

2.2.3.2 Coût d'achat de la litière de paille

Les litières conventionnelles comme la litière de paille peuvent être assez dispendieuses annuellement. Classiquement, la quantité de paille à appliquer pour une vache par jour dans une logette est de 3 kg, mais la quantité de litière utilisée peut aussi varier jusqu'à 15 kg (10). Une analyse économique a été réalisée par l'équipe de Godbout et al. (2019) illustrant le coût annuel d'achat de la paille. Ainsi, selon cette analyse, le prix d'achat moyen de la paille est de 0,22 \$ CA/kg ce qui correspond à un prix moyen pondéré par la quantité déclarée sur le site de transaction

Haybec entre les années 2016 et 2018. De ce fait, le coût total annuel de paille par vache varie entre 296,05 \$ CA (3 kg) et 1 278,09 \$ CA (15 kg) (10). Ainsi, pour un troupeau laitier moyen de 65 vaches, le coût annuel se situe entre 19 240 \$ CA et 83 070 \$ CA ce qui est assez significatif dans le budget d'une exploitation. De plus, le coût d'achat de la paille est sujet à des fluctuations relativement importantes selon les formats, les régions d'origine et l'abondance des récoltes (10). La paille peut être cultivée sur le site même de la ferme permettant de réduire le coût d'achat de la litière. Cependant, aucune étude économique n'a été trouvée dans la littérature permettant de voir les économies engendrées.

2.3 Litière de fumier recyclé

La litière de fumier recyclé est une alternative aux litières conventionnelles comme la litière de paille, de sciure de bois ou encore de sable. Elle est généralement produite à partir d'une séparation physique de la fraction solide du fumier récolté dans les fermes laitières. Ainsi, elle est constituée de fibres végétales non digérées par la vache (10). Face à une augmentation du prix et à une diminution de l'accessibilité des litières conventionnelles, l'intérêt pour la LFR a augmenté ces dernières années auprès des différents producteurs laitiers à travers le monde (12, 38).

La litière de fumier recyclé a été utilisée pour la première fois dans l'ouest des États-Unis en 1970 (92). La litière utilisée lors de cette étude provenait seulement d'une séparation de la matière solide du fumier des vaches pour aboutir à un pourcentage de matière sèche variant de 29 % (fumier asséché) à 90 % (fumier déshydraté). Ces litières étaient comparées à une litière conventionnelle de sable. Les résultats ont été considérés comme étant favorables pour l'utilisation de la LFR sur les bases du temps de repos des vaches, du coût et des caractéristiques physiques (92).

Un paramètre supplémentaire doit toutefois être pris en compte : le développement des bactéries dans la LFR. Il peut être affecté par les conditions climatiques comme la température et l'humidité (11). L'humidité contenue dans cette litière dépend des particules qui la composent. En effet, plus les particules sont petites, plus la litière sera humide (93). Néanmoins, ce type de litière possède une grande absorption (4,2 g d'urine/g de litière) comparativement à une litière inorganique comme le sable (0,3 g d'urine/g de litière). Par ailleurs les émissions de NH_3 , qui ont

un effet néfaste sur la santé humaine et animale, augmentent linéairement avec la capacité d'absorption des litières. Les émissions de la LFR sont de 65 % alors que les émissions de la litière de paille sont de 55 %. Ainsi, il est recommandé de n'utiliser la LFR que dans des bâtiments qui sont aérés (94, 95).

Depuis, sa première utilisation, les méthodes de production ont évolué et plusieurs procédés sont maintenant utilisés afin d'obtenir la LFR. En effet, l'utilisation de presses mécaniques à rouleaux ou à vis ont permis d'obtenir une matière plus sèche. En complément, l'application de technique de conditionnement permettant le compostage conduit à la réduction de la charge bactérienne contenue dans la LFR et à la diminution des risques associés aux agents pathogènes qui pourraient affecter la vache ou l'humain (96). Ainsi, il est possible de retrouver différentes méthodes de production qui peuvent se résumer en grandes catégories : la séparation physique seule, la séparation physique avec des étapes de maturation ou compostage, le compostage dans une cuve rotative à aération contrôlée ou encore le digesteur anaérobique (10-13). Grâce aux diverses améliorations au niveau de la production, il est possible d'utiliser la litière de fumier recyclé dans différents environnements et différentes conditions climatiques (5, 11, 13, 16, 17).

2.3.1 Méthodes de production de la litière de fumier recyclé

2.3.1.1 Séparation mécanique

La première étape de la production de la litière de fumier recyclé est la séparation solide-liquide soit l'extraction de la fraction solide du fumier des vaches laitières. Au Canada et au Québec, plusieurs méthodes de séparation sont utilisées par les producteurs laitiers. La séparation mécanique est effectuée à l'aide de différents équipements tels que : les séparateurs à tamis, les séparateurs à pression à l'aide d'une vis sans fin ou de rouleaux et les séparateurs centrifuges (10, 12). La litière obtenue est directement utilisée dans les logettes par certains producteurs, sans autres traitements (13, 17, 38).

2.3.1.1.1 Les séparateurs à tamis

Ce type de séparateur est peu utilisé dans le secteur de la production laitière canadienne. Ce système consiste à drainer les liquides par gravité dans les pores du tamis et ainsi recueillir la fraction solide. Mais ce type de système est plus propice à s'obstruer que les autres types de mécanismes de séparation. En effet, ce type de séparateur n'offre pas une efficacité de séparation

satisfaisante pour le fumier des bovins laitiers puisqu'il fonctionne généralement mieux avec le fumier contenant un faible niveau de matière sèche ($< 5\%$). Ainsi, le produit final possède 47 % de matière sèche (97).

2.3.1.1.2 Les séparateurs à pression (vis ou rouleaux)

Les séparateurs à vis sont les plus utilisés pour la production de litière de fumier recyclé dans les fermes laitières à travers le monde et la presse à rouleau est également une méthode qui est utilisée couramment. Ce séparateur consiste à presser le fumier contre une paroi pour retirer les liquides. La fraction liquide est recueillie dans un contenant alors que la fraction solide est récupérée à l'extrémité de l'appareil. Le produit final obtenu contient 38 % de matière sèche (97).

2.3.1.1.3 Les séparateurs centrifuges

Ce type de séparateur est plus fréquemment utilisé dans les grandes exploitations agricoles en Asie (98). Ce séparateur utilise un cylindre fermé où des rotations continues sont effectuées. Ce type de séparateur permet d'augmenter la force gravitationnelle afin de séparer la fraction liquide de la fraction solide. C'est la force centrifuge qui sépare les solides des liquides. La fraction liquide et la fraction solide sont transportées aux extrémités opposées du séparateur. En effet, les particules solides sont transportées vers l'extrémité conique et y sont extraites, tandis que le surnageant (fraction liquide) s'écoule vers la plus grande extrémité où il est évacué. Le pourcentage de matière sèche contenue dans la fraction solide produite peut alors atteindre 63 % (97).

2.3.1.2 Maturation

À la suite de l'extraction, une étape de maturation, visant à un compostage, peut être utilisée afin de réduire la charge bactérienne et de détruire les bactéries pathogènes entériques contenues dans le fumier. Le temps nécessaire afin d'effectuer un cycle de compostage va dépendre de divers facteurs comme le ratio de carbone et d'azote, la composition bactérienne initiale, le niveau d'oxygène et la température. Ces derniers peuvent être modulés par la fréquence des retournements ou encore la taille des particules ou de l'amas. De plus, le compostage permet une diminution de l'humidité contenue dans la litière et une stabilisation microbienne (17). Le procédé de compostage doit suivre certaines normes afin que le processus de destruction des bactéries pathogènes soit efficace et adéquat. Tout d'abord, une introduction d'oxygène permet un compostage plus efficace. Ensuite, la température doit atteindre minimalement 55 °C pendant un minimum de trois jours. Cette étape correspond à la phase active du processus permettant la destruction des bactéries

pathogènes. Une fois cette phase atteinte, le compost doit effectuer une période de maturation supplémentaire jusqu'à l'obtention d'une matière foncée et homogène avec une température d'environ 24 °C (ambiante) indiquant que le compost est biologiquement moins actif (99, 100). Le compostage du fumier animal a été associé à une perte d'une grande quantité d'azote sous forme d'ammoniac (NH_3). En contrepartie, le compostage est aussi associé à la production de particules de poussières mettant les microbes en suspension dans l'air ce qui peut causer des problèmes respiratoires pour l'humain et dont l'asthme et les allergies (101).

Le compostage peut s'effectuer en amas statique pour trois à dix jours, en amas retourné fréquemment pendant une période de deux semaines ou dans une cuve rotative à aération contrôlée pour une période de deux à trois jours à une température moyenne de 60 °C. Aussi, une digestion anaérobie du fumier pendant vingt jours à 35 °C peut être effectuée (13, 102). À la fin du processus quel qu'il soit, la litière doit être entreposée (amas, boîte, etc.) sous un abri (103).

2.3.1.2.1 Amas statique et amas retourné

Un amas statique est constitué et laissé à un endroit sans retournement afin d'effectuer une maturation de la matière. Les amas statiques demandent un travail moins intensif que le compostage en amas retournés. En effet, l'absence de retournement limite la libération de NH_3 (conserve l'azote) et des odeurs lors de la maturation (13). De plus, les amas statiques entraînent une plus faible concentration de bactéries mésophiles dans l'air ambiant ($4,0 \times 10^3$ UFC/m³ d'air) comparativement à la production utilisant la cuve rotative ($9,7 \times 10^4$ UFC/m³) (13). Mais, la matière produite n'a pas terminé au complet le processus de compostage. Ainsi, la température augmentera à nouveau pouvant promouvoir la multiplication des bactéries (102).

Un amas retourné est constitué de matière qui est laissée à un endroit, mais qui va subir des retournements réguliers. Le retournement permet d'augmenter la concentration d'oxygène permettant la réduction des microorganismes entériques (13). Il a été démontré par Fournel et al. (2019) que cette méthode de production peut obtenir des résultats similaires au compostage avec la cuve rotative, mais demande une période plus longue (dix jours comparativement à deux jours).

2.3.1.2.2 Cuve rotative à aération contrôlée

La cuve à aération contrôlée permet d'accélérer le processus de compostage. En effet, les bactéries vont décomposer la matière organique en présence d'oxygène. Le processus s'effectue sur une période de deux à trois jours à une température moyenne comprise entre 55 °C et 70 °C selon les différentes sources (102, 104, 105). Ce processus produit une agitation, une aération contrôlée et mélange le compost adéquatement afin d'obtenir une consistance uniforme du produit final (106). La cuve rotative semble diminuer plus efficacement la concentration d'*Escherichia coli* comparativement au compostage en amas sur une même période. Aussi, il a été mentionné qu'un dégagement de la chaleur pouvait survenir si la litière produite était ensuite entreposée en amas sur une trop longue période pouvant ainsi faciliter la croissance des bactéries. Il est donc recommandé d'utiliser cette LFR immédiatement après sa production (102). Ce type de production a été associé à une plus grande présence de champignons mésophiles dans l'air ambiant ($5,6 \times 10^4$ UFC/m³ d'air) et à une plus grande concentration de poussière (0,137 mg/m³ d'air) alors que la limite recommandée est de 0,10 mg/m³ (13). De plus, le compostage avec la cuve rotative atteint la limite recommandée d'exposition bactérienne de 10^5 UFC/m³ d'air ambiant (13).

2.3.1.2.3 Digesteur anaérobique

La digestion anaérobique est un processus où les matières organiques, comme le fumier des vaches, vont être décomposées par les bactéries dans un milieu exempt d'oxygène. Ainsi, le processus s'effectue à une température de 35 °C sur une période de vingt jours. L'extrait est nommé le digestat. Ensuite, le digestat peut subir une extraction solide-liquide afin de produire la litière de fumier recyclé. Cette méthodologie permet de réduire les odeurs. De plus, ce processus permet de générer des biogaz (méthane et le dioxyde de carbone) pouvant être utilisés pour produire de la chaleur et de l'électricité, et ainsi réduire le coût global de l'opération (102, 107). Cependant, ce procédé est moins répandu au Québec puisqu'il est plus rentable pour les fermes ayant un grand troupeau laitier soit plus de 500 vaches (108). De plus, il n'y a pas de réglementation au niveau du Canada quant au standard et à la qualité du digestat. En général, chaque province possède sa propre approche pour réglementer et contrôler l'application du digestat dans les champs ou en tant que litière (une fois le processus d'extraction effectué) (109).

2.3.2 Coût de la litière de fumier recyclé

Le calcul du coût de production de la litière de fumier recyclé doit prendre en compte l'investissement dans l'équipement, le temps de main d'œuvre, le coût en électricité, les temps et coûts de maintenance et de gestion. Ce budget peut être comparé au coût d'achat de la litière conventionnelle comme la litière de paille (10, 103). Selon l'analyse économique de la substitution de la paille par la litière de fumier recyclé de Godbout et al. (2019), il faut au moins que le coût de la paille soit égal au coût de la LFR pour qu'un producteur envisage de substituer la litière de paille pour la LFR. Selon l'étude de Fournel et al. (2019), le coût approximatif d'un séparateur à rouleau est de 75 000 \$ CA, celui d'un séparateur à décantation centrifuge est de 145 000 \$ CA et le coût pour un séparateur à vis est de 75 000 \$ CA. Ces prix n'impliquent pas les coûts d'utilisation comme les coûts d'électricités.

Une analyse économique a été réalisée en prenant en compte les coûts d'exploitation et le budget annuel de l'utilisation d'un séparateur à vis ou d'un séparateur à rouleaux amorti sur la durée de vie de l'équipement (15 ans) (10). Le coût d'utilisation annuel de cet équipement est de l'ordre de 36 000 \$ CA pour un coût annuel par vache d'environ 550 \$ CA. Or, le coût total annuel par vache pour l'utilisation de la litière de paille se situe entre 296 \$ CA et 1278 \$ CA selon les quantités utilisées dans les logettes sachant que le prix d'achat moyen de la paille est de 0,22 \$ CA/kg. Ainsi, le seuil de rentabilité de l'utilisation de la LFR se situe à 6,1 kg de paille par vache par jour si le producteur choisit le séparateur à vis et à 6,2 pour le séparateur à rouleaux (10).

Le coût d'une cuve à aération contrôlée varie selon les fabricants et selon les dimensions de l'appareil. L'investissement total pour ce type de système peut s'élever jusqu'à 400 000 US \$ (104). Les digesteurs aérobiques présentent aussi des coûts variables selon le fabricant et la grandeur du digesteur. Le coût pour le digesteur seul est d'environ 500 000 US \$ et l'installation totale incluant les fosses, les générateurs, les frais d'ingénierie, etc. s'élève à près de 1,14 million de dollars US (110). Mais, ce type de système permet de produire de l'énergie à partir des biogaz, lors de la digestion du fumier, pouvant être transformé en électricité pour les fermes laitières. Ainsi, cette économie additionnée à la production sur place de la litière de fumier recyclé doit être considérée dans le bilan de rentabilité. Ce dernier prévoit des économies de 5 % par année pour les années 4 à 7. Ainsi, il faut attendre quatre années avant de commencer à faire des économies. Ce

système est principalement utilisé dans de grandes fermes avec plus de 500 vaches laitières pour un maximum de 1 500 vaches (108, 110).

Les divers appareils possèdent des coûts d'achats variés et l'investissement peut être remboursé en quelques années, permettant par la suite de faire des économies. Ainsi, le coût de la LFR est finalement moindre sur le long terme dans la grande majorité des situations.

2.3.3 Risques associés à l'utilisation de la litière de fumier recyclé

L'utilisation de la litière de fumier recyclé peut présenter certains risques et générer des inquiétudes de la part des producteurs puisque cette litière est une litière organique, issue du fumier de la vache et d'un processus finalement instable, étant influencé par divers facteurs, dont l'alimentation, la température, l'humidité, les saisons ou encore la méthodologie de production. De plus, la litière de fumier recyclé produite n'est pas une matière homogène puisque les extrémités d'un amas de LFR peuvent avoir une évolution différente ce qui peut entraîner des différences dans la composition de celle-ci (ex. couleur, taille, humidité, etc.) (11, 103). Même si les processus de compostage et de digestion possèdent un potentiel de réduction de la charge bactérienne lorsqu'effectués adéquatement, il est possible de retrouver des bactéries pathogènes qui résistent au processus de compostage ou qui se développent lors de l'entreposage de la LFR (15, 111). Cela peut indiquer un simple problème de gestion de la température comme l'indique le rapport de Bradley et al. (2014), mais généralement, la LFR possède une concentration bactérienne plus élevée que les autres types de litières organiques (34). De plus, une étude de Lasprilla-Mantilla et al. (2019) a démontré que certains microorganismes zoonotiques n'étaient pas affectés par la méthode de production de la LFR. C'est le cas de *Cryptosporidium* spp. plus précisément *C. parvum*, *C. andersoni* et *C. meleagridis* qui ont été détectés dans 85 % des échantillons de LFR. Selon cette même étude, il a même été suggéré que la LFR promouvait la transmission parmi le troupeau laitier (112). Ces dangers biologiques (bactéries pathogènes et parasites) peuvent avoir une incidence sur la santé de la vache tout comme sur la santé humaine et induire des pertes économiques auprès des producteurs laitiers.

Généralement, la LFR possède une concentration bactérienne plus élevée que les autres types de litières organiques avant même son introduction dans les logettes (de l'ordre de 1 log₁₀ UFC/g de plus que la paille) et les concentrations bactériennes des staphylocoques, des streptocoques et d'*Escherichia coli* sont nettement plus élevées dans la litière de fumier recyclé

que dans les litières organiques conventionnelles, comme la paille, et ce de $2 \log_{10}$ UFC/g (11, 13, 34, 113, 114). Mais, l'étude de Fournel et al. (2019) indique que les différents types de productions influencent la concentration des certains types de bactéries dans la LFR. Par exemple, le compostage à l'aide de la cuve rotative diminuerait particulièrement la concentration des bactéries *Escherichia coli* (passant de 1.0×10^5 à 2.0×10^1 UFC/g) et des bactéries *Klebsiella* (de 3.2×10^4 à 4.0×10^2 UFC/g) (13).

2.3.3.1 Risques au niveau de la santé animale

Aucun lien direct entre l'utilisation de la litière de fumier recyclé et la prévalence de maladies infectieuses incluant les mammites n'a été établi selon l'étude de Leach et al. (2015) (11). De plus, il a été démontré que les mammites subcliniques n'étaient associées à aucun type de litière en particulier (115). Même si la relation entre la prévalence d'infections intramammaires et l'utilisation de la LFR n'a pas été établie, il faut, de façon générale, souligner qu'une haute concentration bactérienne dans la litière augmente la prévalence de ce type d'infection en période de tarissement et ce peu importe le type de litière (113). Plus spécifiquement, un lien entre l'usage de la LFR et les mammites à *Klebsiella* spp. a été rapporté par plusieurs études (11, 52, 116, 117). Il a été démontré que la présence de bactéries pathogènes dans la litière, pouvant causer des mammites, peut influencer la production et la qualité du lait (16, 17, 118). Plusieurs de ces bactéries pathogènes ont été dénombrées dans la litière de fumier recyclé, et les dénombrements de *Klebsiella*, de coliformes et de *Streptococcus* sont plus élevés d'environ $1 \log_{10}$ UFC/g dans la LFR fraîche que dans la LFR compostée (118). De plus, des corrélations ont été rapportées entre les dénombrements bactériens des différents types de litière et les résultats d'analyse d'écouvillons de la peau des trayons des vaches. Ainsi, généralement, le nombre relatif de bactéries présentes sur la peau des trayons correspond à une exposition à de la litière contaminée et peut altérer l'incidence des mammites cliniques (16). Plusieurs bactéries, comme les coliformes, étaient plus présentes dans la LFR (2.2×10^6 UFC/g), comparativement aux autres bactéries à Gram négatif, plus retrouvées dans la litière de sable. De même, la LFR contient plus de *Klebsiella* que les autres types de litière (6, 16).

2.3.3.2 Risques au niveau de la santé humaine

Au niveau de la santé humaine, très peu d'études ont évalué le risque associé à ce type de litière sur la santé du personnel à la ferme, et les différents avis disponibles sont mitigés (11, 119).

Certaines bactéries pathogènes préoccupantes pour la santé humaine peuvent être excrétées dans les fèces des bovins laitiers et ainsi contaminer l'équipement ou encore le personnel et ultimement le lait. Ainsi, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. et *Listeria monocytogenes* peuvent être excrétées et entrer dans le processus de production de la LFR. Elles peuvent perdurer si les méthodes de production ne sont pas adéquates pour les éliminer (15). Par exemple, une étude mentionne une association entre l'utilisation de la LFR et la présence de *Salmonella* dans les fèces des vaches. Toutefois, les avis sont mitigés quant à l'impact de la LFR sur l'augmentation de la présence de *Salmonella* et *Listeria monocytogenes* (11, 119). Le respect des mesures d'hygiène de la part des employés dans la ferme permet de réduire les risques de se contaminer avec ces bactéries pathogènes. De plus, le nombre total de bactéries présentes dans un réservoir de lait n'était pas associé au type de litière (120). Toutefois, la méthode de production peut générer un risque avec l'aérosolisation des bactéries lors du compostage et avec le dégagement d'ammoniaque (13).

2.3.4 Avantages possibles de la litière de fumier recyclé

La litière de fumier recyclé possède a priori quelques avantages comparativement aux litières conventionnelles. L'un des principaux avantages de l'utilisation de la LFR est son accessibilité puisqu'elle est produite directement à la ferme. Ainsi, elle est sous le contrôle de la ferme sans dépendance d'un fournisseur extérieur et est moins sujette aux aléas du climat. De plus, la litière de fumier recyclé est compatible avec les différents systèmes de gestion du fumier. La litière de fumier recyclé présente de plus un avantage écologique puisqu'elle ne nécessite pas de transport et elle est réutilisable. La fraction liquide extraite du fumier peut être employée comme un fertilisant organique dans les champs. Elle est moins dispendieuse selon les quantités de litière nécessaires, comparativement à la litière conventionnelle de paille (11). Ainsi, elle possède un avantage économique puisqu'elle peut être produite en grande quantité et elle est fabriquée à partir d'une ressource non limitée, car une vache produit en moyenne entre 50 et 60 kg de fumier par jour (121). De plus, les caractéristiques physiques de la LFR suggèrent des avantages potentiels sur le confort des vaches puisque c'est une matière douce et non abrasive. Il a été démontré par les études de Keys et al. (1976), Feiken et Van Laarhoven (2012) et Leach et al. (2014) que les vaches avaient une préférence pour le confort de la litière de fumier recyclé comparativement aux litières conventionnelles de paille, de sciure de bois ou encore de sable (92, 103, 116).

Les lésions du jarret étaient moins fréquentes sur la LFR (45-53 %) comparativement à celles observées pour des vaches couchées sur des matelas (63-72 %) (25). La réduction d'occurrence des lésions du jarret pourrait être expliquée par la plus grande quantité de litière de fumier recyclé utilisée (11, 122). Toutefois, selon une autre étude, les vaches sur LFR avaient une prévalence de lésions sévères du jarret plus élevée que sur les litières de sable ou de paille pour une quantité semblable de litière. Une amélioration de l'état de propreté des vaches a également été observée par des producteurs et certaines études (103, 111, 116). Cependant, la propreté visuelle ne signifie pas une absence d'agents pathogènes (103, 111, 116). Ainsi, cette litière augmenterait le confort, réduirait la fréquence de lésions du jarret et améliorerait la propreté des vaches laitières (13, 15).

Aussi, il a été rapporté que l'utilisation de la LFR dans les logettes sous les vaches génère moins de poussière comparativement à la litière de paille ou à la litière de sciure de bois. Cela représente un avantage pour la santé respiratoire tant de l'animal que de l'humain et cela réduit le risque de transmission de bactéries pathogènes par les particules de poussière (103, 111).

2.4 Le microbiote des litières

Le microbiote est l'ensemble des organismes microbiens (bactéries, virus et levure) qui vivent au sein d'un environnement déterminé (123). Le microbiote intestinal possède une grande importance, autant chez l'humain que chez les animaux, puisqu'il intervient de façon très documentée dans la digestion et la santé en général. Le microbiote digestif possède un rôle dans le développement du système immunitaire intestinal (éducation et régulation), la maturation cellulaire mucoale (prolifération et différenciation), la régulation du métabolisme de l'hôte (stockage des acides gras), la protection vis-à-vis des bactéries pathogènes et la régulation de l'expression génique intestinale. Ainsi, il a des fonctions de protection, de structuration, de métabolisme et de nutrition et ce microbiote interagit avec l'hôte afin de réguler la physiologie et l'immunité de ce dernier, finalement contribuant à l'adaptation à son environnement (123, 124).

Le microbiote digestif peut être influencé par de multiples facteurs comme l'alimentation (nature et quantité), l'âge et l'environnement (ferme et région). Pour une espèce animale et un compartiment digestif donné. Les compositions et concentrations bactériennes du microbiote digestif vont donc présenter une grande diversité (124, 125). Bien que le microbiote digestif

commence à être bien documenté, très peu d'informations sont disponibles quant au microbiote des différentes litières utilisées dans les fermes laitières.

2.4.1 Processus d'analyse du microbiote

La méthode d'étude du microbiote par la caractérisation des génomes bactériens présents dans un écosystème se nomme la métagénomique (126). Il s'agit d'une technique de séquençage et de l'analyse de l'ADN contenu dans une matrice, dans notre cas les litières. Ainsi, cela permet de déterminer la composition en abondance et en diversités microorganismes de la matrice d'intérêt. Le processus d'analyse du microbiote utilise le séquençage à haut débit et nécessite des traitements de bio-informatique.

Le gène codant pour l'ARN de la sous-unité ribosomique 16S (l'ARNr 16S) est un gène rapporteur de 1500 pb qui est universellement présent dans les bactéries et possède des séquences hautement conservées qui encadrent des séquences qui varient selon l'espèce bactérienne. Ainsi, l'ARNr 16S peut être facilement amplifié à l'aide d'amorces universelles qui encadrent les régions variables. Neuf régions hypervariables (V1 à V9) peuvent être choisies pour distinguer les différents organismes bactériens (127, 128). Ainsi, ce gène est un marqueur moléculaire qui est très utilisé. L'analyse (l'identification des espèces à partir des séquences amplifiées) s'appuie sur la consultation de banques de données, contenant l'information sur les séquences accumulées lors des analyses précédentes (129, 130). Puisque la technologie de séquençage à haut débit ne permet pas d'accéder à l'ensemble des 1500 pb d'une manière fiable, il faut choisir une de ces régions variables à séquencer. La plateforme Miseq d'Illumina, qui est l'une des technologies de séquençage les plus utilisées, peut séquencer des fragments jusqu'à 300 pb pairées. La région de l'ARNr 16S est choisie entre autres en fonction de la technologie de séquençage afin d'obtenir un chevauchement maximal des deux brins séquencés. Ceci permet de minimiser les erreurs de séquençage (126, 127). La région V4 est souvent privilégiée pour sa taille, compatible avec le pairage des deux brins d'ADN séquencés, mais aussi pour la richesse des banques de données constituées (129). Après l'amplification par PCR s'appuyant sur les amorces universelles encadrant cette région V4, les amplicons seront séquencés et un traitement bio-informatique sera réalisé afin d'assembler, nettoyer, aligner, filtrer, classer et attribuer les différentes séquences obtenues. Le logiciel MOTHUR est un outil bio-informatique pour traiter et nettoyer les séquences obtenues lors

du séquençage. Plusieurs chaînes d'analyse de séquençage par amplicon 16S ont été développées et sont offertes en support comme les méthodologies de QIIME et MOTHUR (131, 132).

La première étape de l'analyse bio-informatique consiste à effectuer l'assemblage de tous les résultats obtenus afin de vérifier si l'alignement des brins d'ADN (sens et antisens) est correct et que la séquence finale assemblée est sans ambiguïté. De plus, tous les fragments ne correspondant pas à la taille attendue seront éliminés ainsi que les séquences de faible qualité et les chimères (133). Ces différentes étapes correspondent au nettoyage des séquences qui est capital, car il permet de ne pas surestimer le nombre de séquences uniques pour ne pas biaiser l'analyse de la richesse subséquente (134). Les séquences très similaires sont regroupées formant ainsi une unité taxonomique opérationnelle (OTU) permettant de faciliter les analyses subséquentes et d'augmenter la rapidité d'exécution des analyses. Typiquement, un seuil de similarité de 97 % est utilisé afin de regrouper les différentes séquences et de diminuer les séquences uniques (135, 136). Ce seuil est classiquement retenu pour différencier les séquences au niveau de l'espèce bactérienne. Il est aussi possible d'utiliser les séquences sans les regrouper en OTU. Ainsi, une séquence équivaut à un OTU permettant d'observer les OTUs rares ou uniques. Ensuite, une assignation taxonomique de la séquence majoritaire représentant l'OTU ou de la séquence (si l'approche sans OTU est employée) sera effectuée. Cette assignation est réalisée par consultation de bases de données de références telles que Silva et RDP (134). Différentes analyses peuvent être effectuées afin de comparer les richesses et les compositions (la diversité alpha) et la comparaison de la diversité des échantillons entre eux (la diversité bêta).

La diversité alpha est une mesure qui caractérise la diversité au sein d'un échantillon en exprimant la richesse en nombre de séquences ou d'OTU unique d'une part, et leurs représentations respectives (l'Eveness). La richesse représente le nombre de séquences différentes qui sont présentes dans un échantillon alors que l'Eveness représente la distribution de ces séquences (137). Les informations sur la diversité alpha sont apportées par différents indices dont notamment l'indice Obs. (observé), l'indice de Shannon et l'indice inverse de Simpson et sont comparés à l'aide de test statistique comme l'ANOVA ou le test de T. L'indice Obs. correspond au nombre d'OTUs observées dans l'échantillon. L'indice de Shannon permet de comparer l'abondance relative des différents OTUs présents et l'indice inverse de Simpson indique la probabilité que deux individus choisis au hasard dans un échantillon appartiennent à des espèces différentes. Ainsi, plus

les indices Shannon et inverse de Simpson sont élevés, plus la diversité est grande (138, 139). La diversité alpha est une mesure propre à un échantillon.

La diversité bêta propose de représenter le microbiote d'un échantillon par rapport à l'ensemble des autres. Ceci indique donc que la diversité bêta n'est pas fixe pour un échantillon et que les résultats obtenus dépendent des groupes d'échantillons qui sont comparés. Cette localisation d'échantillon par rapport au groupe s'appuie sur les différences au niveau de la structure et de la composition (140). Les structures de microbiotes sont comparées par le calcul de matrice de dissimilarité utilisant le coefficient de Jaccard et l'indice de dissimilarité de Bray Curtis. Le coefficient de Jaccard considère la présence ou l'absence des différents OTUs observées dans l'ensemble de la population (141). L'indice de dissimilarité de Bray Curtis prend en compte l'abondance relative des OTUs (lorsque la taille des populations est harmonisée) (142). Ces coefficients permettent d'établir des mesures de distances entre les différents échantillons. Ensuite, les différences structurales entre microbiotes sont visualisées dans un graphique à un nombre de dimensions x . Le résultat obtenu peut être observé par projection sur un plan bidimensionnel ou tridimensionnel par des représentations graphiques NMDS (Non-metric multidimensional scaling). Ce graphique permet d'identifier visuellement les proximités des populations de l'étude (143). Ensuite, des tests statistiques (AMOVA, ADONIS ou HOMOVA) testent la significativité des distances qui ont été calculées entre les échantillons (144).

Finalement, des analyses différentielles de compositions peuvent être réalisées. Différents tests statistiques, par exemple un MaAslin (Multivariate Analysis by Linear Models), permettent de savoir si un genre bactérien est plus associé à un certain facteur comme l'âge ou encore le sexe et donc suggère des biomarqueurs. Pour ce faire, une base de données (SilVa, RDP) doit être utilisée pour permettre l'association taxonomique des OTUs ou séquences (145).

2.4.2 Microbiote de la litière de paille

Bien que la paille soit l'un des types de litière les plus utilisés à travers le monde, et ce depuis plusieurs années, son microbiote demeure peu décrit dans la littérature. En effet, la paille a été principalement étudiée pour son impact sur le microbiote du sol ou encore sur le microbiote du rumen (lorsqu'ingérée) (146-148). Les différents types de paille (maïs, riz, etc.) possèdent des microbiotes différents. En effet, la paille de riz est composée à environ 70% de Proteobacteria suivie des Actinobacteria (environ 20%), des Bacteroidetes (6%) et des Firmicutes (4%) (147). Une

autre étude présente d'emblée les résultats au rang taxonomique de la famille et indique que le microbiote de la paille de maïs est composé principalement par des *Lactobacillaceae* (45.8%) suivit par les *Acetobacteraceae* (32.4%), les *Bacillaceae* (4.63%) et les *Enterobacteriaceae* (3.44%) (149). De plus, la provenance de la paille peut influencer le microbiote de celle-ci. En effet, la paille provenant d'une certaine région possèdera une abondance relative différente des différents groupes de microorganismes majoritaires qui la compose (149). Plus subtilement, il a été démontré que le microbiote de la paille de lin pouvait même être influencé par la méthode de séparation de celle-ci (150).

2.4.3 Microbiote gastro-intestinal de la vache

Le système digestif de la vache comporte quatre compartiments : réticulum, rumen, omasum et abomasum. Le rumen est le compartiment le plus volumineux puisqu'il représente plus de 90% du volume total des préestomacs. Ainsi, le rumen permet de prédigérer les matières végétales fibreuses. De plus, le rumen est considéré comme un fermenteur anaérobique et méthanogène puisqu'il présente ses caractéristiques. En effet, le rumen est composé d'un milieu riche en eau (85 à 90%) avec un pH de 6.4 à 7.0 avec une température de 39 à 40 °C. De plus, il y a un apport régulier de nutriments, une élimination des produits terminaux de la digestion microbienne et des échanges permanents à travers la paroi du rumen. Ainsi, toutes ces conditions sont propices au développement du microbiote du rumen (151, 152). Ces microorganismes ont la capacité d'utiliser et d'augmenter la productivité des aliments cellulolytiques (foin, paille, etc.) et permettent de fournir des nutriments à la vache (153, 154). Environ 60% de la masse microbienne est responsable de la dégradation et de la fermentation des biopolymères.

La concentration des bactéries retrouvée dans le rumen est de l'ordre de 10^9 à 10^{11} bactéries/mL et plus de 200 espèces sont représentées (154). Le microbiote est constitué, principalement, de bactéries anaérobies strictes telles que les *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp. et *Bifidobacterium* spp., alors que les *Enterobacteriaceae*, comme *Escherichia coli* (bactérie anaérobie facultative), sont cent fois moins présentes (155). Cette communauté microbienne est dominée par les Firmicutes (*Butyrivibrio*, *Lachnospira*, *Scinciclasticum* et *Ruminococcus*) et les Bacteroidetes (*Prevotella*). Les archaea et les eucaryotes représentent chacun environ 1% de la masse microbienne (156). Les Bacteroidetes et les Firmicutes représentent 51% et 42% du microbiote du rumen suivi par les Proteobacteria (5%) (157).

Naturellement, cette composition microbienne peut être influencée par divers facteurs, dont l'alimentation. En effet, l'alimentation peut faire varier le pH et ainsi influencer la composition et la structure du microbiote présent. De plus, la maturité des cultures végétales et le type de fourrage influencent la capacité à dégrader la cellulose contenue dans ces végétaux, influencent l'énergie produite et influencent finalement la composition microbienne du rumen. Ainsi, l'impact de différentes diètes a affecté la concentration des *Prevotella*, des *Butyrivibrio* et des *Ruminococcus* (154).

La transition de la période sèche à la période de lactation peut aussi influencer la composition microbienne du rumen. Le rumen subit une perte transitoire importante de sa diversité microbienne après le vêlage, ensuite, un processus de recolonisation s'effectue, mais n'impliquant pas la même diversité bactérienne (158).

De plus, la diversité et la composition, entre les régions du système digestif de la vache, sont différentes comme l'illustre une étude de 2015 (159). L'abondance relative, des principaux phylums composant le système digestif de la vache (Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Spirochaetae, Tenericutes et Cyanobacteria), varie dans les différentes régions du tube digestif. Ces phylums sont présents dans tout le tube digestif (rumen, réticulum, omasum, abomasum, duodénum, jéjunum, iléon, ceacum, côlon et rectum). Selon cette même étude, la composition microbienne du petit intestin diffère de celui du gros intestin (159). La diversité microbienne du côlon est influencée par les périodes de vêlage puisqu'elle diminue après cette période (158). La composition du microbiote du système digestif de la vache peut ultérieurement influencer le microbiote du fumier de la vache (159).

2.4.4 Microbiote du fumier

Le microbiote de la matière fécale des vaches est influencé par plusieurs facteurs. En effet, le type de logette, l'alimentation, la ferme, l'âge et la santé de la vache peuvent affecter la diversité microbiologique du microbiote fécale (160-162). En effet, l'abondance relative des différents phylums peut varier selon les fermes et peut par le type de logette utilisé dans la ferme hormis pour les Spirochaetes et les Bacteroidetes qui sont assez stables (160).

De plus, plusieurs études ont porté sur l'influence de l'alimentation sur le microbiote fécal des vaches. En moyenne, les Firmicutes (61%), les Bacteroidetes (28%), les Proteobacteria (3%),

les Tenericutes (0,15%), les Nitrospirae (0,11%) et les Fusobacteria (0,086%) sont retrouvés dans les fèces des vaches, quel que soit le traitement alimentaire (163). Les Firmicutes et les Bacteroidetes sont donc les phylums dominants et leur contribution au microbiote des fèces des vaches est majeure (160). Cette prédominance peut provenir du rumen puisque les phylums majoritaires de celui-ci sont aussi les Firmicutes et les Bacteroidetes (154).

L'âge est l'un des facteurs pouvant influencer le microbiote des fèces. Selon une étude de Klein-Jöbstl et al. (2019), le microbiote des veaux est très variable durant les 48 premières heures de vie. Des changements significatifs ont été rapportés dans la diversité et la richesse des espèces bactériennes contenue dans ces microbiotes. La population bactérienne des échantillons fécaux des veaux est constituée majoritairement d'*Enterobacteriaceae* alors que celle des échantillons fécaux des vaches est dominée par les *Ruminococcaceae*. De plus, les matières fécales de la vache présentent une plus grande diversité et une plus grande richesse que les échantillons fécaux des veaux. Cette différence peut s'expliquer par l'alimentation : le veau ne se nourrit que de liquide (lait maternel) alors que la vache possède un système de digestion complexe et se nourrit de fourrage (161). De plus, il a été mentionné que le microbiote des fèces du veau pourrait provenir du vagin de la vache lors de la naissance, mais cette idée est controversée dans la littérature (164, 165).

Finalement, selon une étude de 2008, les genres bactériens prédominants retrouvés dans le fumier incluaient les *Clostridium*, les *Bacteroides*, les *Porphyromonas* et les *Ruminococcus* (155). Mais, selon une autre étude publiée en 2020, les genres bactériens dominants retrouvés dans le fumier seraient les *Corynebacterium*, des *Clostridium*, des *Romboutsia* et des *Turicibacter* (166). Ainsi, la composition du microbiote des matières fécales varie d'une étude à l'autre. Ces différences peuvent être expliquées autant par des facteurs environnementaux que des facteurs physiologiques des vaches, voire des facteurs méthodologiques. Le facteur « ferme » peut influencer la composition du microbiote comme mentionné ci-haut (160, 162).

2.4.5 Microbiote de la litière de fumier recyclé

Le microbiote de la litière de fumier recyclé utilisée dans les fermes laitières est très peu documenté dans la littérature. Ces études ont porté sur l'influence de la litière de fumier recyclé sur le microbiote du lait, et les études sur le microbiote des fèces ont été réalisées avant tout afin de voir son impact sur le sol des terrains agricole (167, 168). Ainsi, plusieurs études se sont

intéressées au microbiote du fumier composté et du microbiote des fractions solides et liquides du fumier puisque le fumier est souvent utilisé comme fertilisant dans les champs (166, 169, 170).

Entre une simple maturation des fèces (stockage) et un compostage, les conditions appliquées sont très différentes et modulent le microbiote. En effet, la température, le niveau d'oxygène, de carbone et d'azote peuvent être différents et ainsi influencer la croissance/survie des différentes populations bactériennes contenue initialement dans le fumier (169-171). Les différentes étapes du compostage du fumier modulent la structure du microbiote de celui-ci. En effet, la diversité microbienne est différente lors des différentes étapes du compostage (initial, thermophile, refroidissement et maturation), le pH variant tout au long du processus (8,8 à 7,2), ainsi que la température (28 °C à 60 °C) ou encore les taux d'azote et de carbone disponibles dans les diverses étapes (171). Ainsi, il a été rapporté que la diversité microbienne baisse significativement durant les premières étapes du compostage et se rétablit (avec une composition microbienne différente) lors de l'étape de maturation. Cette variation a aussi été observée dans d'autres études portant sur le compostage (166). En effet, le fumier frais est principalement composé d'*Actinobacter* (9.9%), de *Psychrobacter* (2.5%) et d'*Enterococcus* (2.5%) alors que le fumier composté est principalement composé de *Planifilium* (6.4%), d'*Actinobacter* (6%) et de *Flavobacteriaceae* (4.4%). Ainsi, lors de la phase initiale du compostage, des *Corynebacterium*, *Clostridium XI* sont observés alors que les *Bacillus* et les *Geobacillus* sont plus souvent observés lors de la phase thermophile (166).

Le microbiote de la LFR peut aussi être influencé par l'utilisation des vaches dans les logettes. Il a été rapporté dans la littérature que l'environnement de la ferme (litière, équipement de traite, insecte, etc.) peut moduler le microbiote de la glande mammaire et l'inverse pourrait aussi s'appliquer (172). Cependant, peu d'étude s'intéresse à l'influence de la vache sur le microbiote de la litière et c'est plutôt l'inverse qui est souvent étudié.

Le fumier bovin peut être utilisé comme engrais sur les terres agricoles sous diverses formes. Ainsi, on retrouve la partie liquide et la partie solide du fumier qui possèdent des microbiotes différents. En effet, une étude de 2018 a révélé que le microbiote différait entre la fraction liquide du fumier et la fraction solide. Le genre bactérien *Sulfuriomonas* était unique à la fraction liquide alors que le genre *Thermos* était unique à la fraction solide (170). Ainsi le traitement du fumier peut influencer la composition de son microbiote. La séparation des fractions solide et

liquide change la composition et la diversité des microbiotes. En effet, l'humidité, le pH et la température ainsi que la méthode d'entreposage peuvent être différents entre la fraction liquide et solide (170).

3 Hypothèse et Objectifs

La revue de littérature présentée ci-dessus a permis de mettre en lumière l'état des connaissances actuelles sur la litière de fumier recyclé, limité et d'origines diverses. De plus, certains résultats apparaissent contradictoires quant aux avantages et désavantages de l'utilisation de la LFR notamment sur l'impact de la présence de *Listeria monocytogenes* et *Salmonella* spp. sur la santé animale et humaine (11, 15, 119). De plus, cette revue a permis d'exposer les faibles connaissances au niveau du microbiote de la LFR comparativement aux connaissances portant sur le microbiote intestinal et fécal de la vache. Finalement, cette revue a aussi permis d'observer que, bien que la litière de paille soit la plus utilisée, peu d'information est disponible quant à la composition et la diversité de son microbiote.

Ainsi, plusieurs hypothèses ont été posées afin de répondre à la question suivante : est-ce que l'utilisation de la LFR est adéquate pour les vaches laitières? Cette question se pose puisqu'un risque pourrait survenir quant à la possible présence de bactéries pathogènes zoonotiques pouvant altérer la santé animale et humaine et la qualité du lait. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que l'utilisation de la LFR pourrait introduire une nouvelle population microbiologique pouvant être défavorable à la préservation de la santé animale et humaine par rapport à la litière de paille et que les différentes méthodes de production de la LFR pourraient avoir un impact sur la qualité microbiologique de la LFR.

L'objectif de ce projet de recherche était, premièrement, de décrire les caractéristiques microbiologiques de la litière de fumier recyclé lorsqu'elle est utilisée dans les différentes fermes laitières de l'est du Canada, en fonction des méthodes de productions, en utilisant à la fois la microbiologie classique (dénombrements bactériens) et le séquençage à haut débit, et de comparer la LFR à la litière conventionnelle de paille. Le second objectif était d'évaluer et comparer la présence de deux agents zoonotiques, *Listeria monocytogenes* et *Salmonella* spp., dans la LFR comparativement à la litière de paille.

4 Méthodologie et Résultats

INTERPRETATIVE SUMMARY

(en préparation pour soumission dans Journal of Dairy Science)

Comparison of Microbiota of Recycled Manure Solids and Straw Bedding used in Dairy Farms from Eastern Canada. By Beauchemin et al. Recycled manure solid (RMS) is an economic alternative bedding used in dairy farms, but poorly documented in eastern Canada farming conditions. We described RMS microbiota before and after being used under dairy cows. Microbiota of used and unused RMS bedding samples were very similar, while used and unused straw bedding were different. which suggested that the RMS maturation was not carried out under optimal conditions. The different RMS production systems did not influence the alpha diversity but influence its composition (beta diversity). Finally, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* were more frequently detected in RMS, compared to straw.

Articles scientifiques

(en préparation pour soumission dans Journal of Dairy Science)

RECYCLED MANURE SOLID BEDDING

Comparison of Microbiota of Recycled Manure Solids and Straw Bedding used in Dairy Farms
from Eastern Canada

Jessika Beauchemin,^{1,2,3} Annie Fréchette,^{1,3} William Thériault,^{1,2} Simon Dufour,^{1,3} Philippe
Fravalo,^{1,2} and Alexandre Thibodeau^{1,2,4}

¹ Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de
Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec J2S 2M2 Canada

² Chaire de recherche en salubrité des viandes (CRSV), Université de Montréal, Saint-Hyacinthe,
Québec J2S 2M2 Canada

³ Regroupement FRQ-NT Op+Lait, Saint-Hyacinthe, Québec J2S 2M2 Canada

⁴ Centre de recherche en infectiologie porcine et avicole (CRIPA-FRQNT), Saint-Hyacinthe,
Québec J2S 2M2 Canada

ABSTRACT

Recycled manure solids bedding (RMS) is an alternative bedding option growing in popularity in Canadian dairy farms. Microbiological characteristic and production of RMS bedding, however, is poorly documented under on-farm conditions in eastern Canada. This bedding could support the presence of pathogens and could have an impact on cow and human health. The aim of this study was to describe RMS microbiota when used under dairy cows and compared it to straw bedding. Unused and used bedding of 27 RMS and 61 straw-bedded dairy farms were collected and compared using 16S amplicon sequencing, bacterial counts as well as *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* detection. Unused RMS and unused straw microbiota composition were different. After usage, both bedding microbiota were similar for their bacteria composition, structure, and diversity. Unused RMS contained higher bacterial counts than unused straw, in general, except for *Klebsiella* spp. counts. *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* were more frequently detected in unused RMS (*Salmonella* spp.: 11%; *Listeria monocytogenes*: 30%), than in unused straw (*Salmonella* spp.: 0%; *Listeria monocytogenes*: 11%). Finally, the different RMS production systems (mainly an extraction of the liquid fraction followed by maturation in a box vs. in a heap) did not influence the microbiota richness and bacteria distribution (alpha diversity), but influenced the microbiota structure (beta diversity). In conclusion, animal and human pathogens were found in greater numbers and more frequently in RMS and this could eventually impact dairy cow or human health.

Key Words: dairy cow, bedding, recycled manure solids, straw, microbiota

INTRODUCTION

Various beddings are used on dairy farms from Eastern Canada. In this region, straw is the most common option chosen by producers (Dufour et al., 2010). The annual cost for straw, however, was reaching 542 Can\$ per cow per year in Eastern Canada (Ontario and Quebec) in 2019 (Godbout et al., 2019). Therefore, there is a growing interest for alternative bedding options such as recycled manure solids bedding (**RMS**).

Recycled manure solids bedding can be produced on the farm. Usually, a fraction of the liquid contained in the manure is extracted using a screw or, a roller press. The liquid fraction of the manure can then be used as an organic fertilizer in fields (Godbout et al., 2019). The remaining solid fraction can be used immediately as bedding, but it will often be further processed using various maturation methods such as static heap, turned windrow, or a drum composter (Leach et al., 2015, Fournel et al., 2019a, Fournel et al., 2019b). During maturation, the materials' temperature should increase due to bacterial fermentation and therefore ensue a reduction of the total bacteria concentration (Carroll and Jasper, 1978, Leach et al., 2015). In larger farms, anaerobic digesters can also be used to produced RMS (Leach et al., 2015). Currently, there is no legislation guiding RMS production and/or usage in Canada. This situation leads to a large variation in RMS production methods as each farmer are using their own RMS production system, often home-made.

Some studies identified various benefits associated with RMS such as increase comfort, reduced hock lesions, and an improve cleanliness of dairy cows (Green et al., 2014, Bradley et al., 2018). On the other hand, other studies observed important amounts of undesirable bacterial populations such as *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp. and *Staphylococcus* spp.

These bacteria can cause mastitis and impact, milk production and quality (Cole and Hogan, 2016, Rowbotham and Ruegg, 2016a). A study was reporting an association between the use of RMS and mastitis caused by *Klebsiella* spp (Leach et al., 2015). Moreover in general, the relative number of bacteria present on the teat skin was associated with bedding and, therefore, could possibly alter the incidence of clinical mastitis (Rowbotham and Ruegg, 2016b).

Lasprilla-Mantilla et al., (2019) demonstrated that *Cryptosporidium* spp. (mainly *C. parvum*, *C. andersoni*, and *C. meleagridis*), a zoonotic microorganism, was not controlled by the RMS production methods used on Eastern Canada dairy farms. They found that this pathogen was more frequently recovered in adult cows' feces from RMS farms (85%) compared than farms using straw (49%). They suggested that use of RMS could promote within herd persistence of this pathogenic agent.

Several studies compared the bacterial load of RMS bedding with other bedding types in the US, UK, and Ontario (Godden et al., 2008, Bradley et al., 2018, Robles et al., 2020). Knowledge is still scarce on the evolution of the RMS microbiota before and after usage in our Northern conditions. The possibility of maintaining or even promoting pathogenic and zoonotic microorganisms in a farm were poor documented. The objective of this study was to describe the RMS microbiota in Eastern Canada dairy farms by production methods using both culture dependent (i.e., bacterial counts) and non-dependent (high throughput sequencing) methods and to compare the results to straw bedding. A second objective was to investigate the presence of two zoonotic agents, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in RMS and straw. We hypothesized that RMS usage would introduce new microbiological bedding conditions, potentially compromising cow and human' health.

MATERIALS AND METHODS

Farm Recruitment and Sampling

All procedures were approved by the Animal Care and Use Committee for the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal (protocol 17-Reach-1886). Study design was an observational cross-sectional study and was thoroughly described in Lasprilla-Mantilla et al., 2019 (Lasprilla-Mantilla et al., 2019) and Gagnon et al., 2020 (Gagnon et al., 2020). Briefly, a list of RMS farms located within 250 km of the Faculty of Veterinary Medicine at Université de Montréal (Saint-Hyacinthe, Qc, Canada) in the provinces of Quebec and Ontario was constituted by contacting veterinarians, via social networks, and through equipment dealers. All of the identified RMS farms owners were contacted and asked for participation in the study. The selection criteria for RMS farms to be included were as follows: 1) the RMS farms needed to use RMS as the primary bedding type for the lactating cows; and 2) RMS needed to have been used for at least 6 months prior the start of the study. A number of farms using straw were selected, for comparison, and were recruited in the same area and with similar criteria as RMS farms to reach a total number of farms of approximately 90. Caused to budget constraints and other parameters, 2:1 ratio of straw vs RMS was used for farm selection. Straw-bedded farms recruitment was made with the help of the Eastern Canada DHI association (Valacta Inc., Sainte-Anne-de-Bellevue, QC, Canada). Thus, straw-bedded farms were all conducting regular DHI milk control analyses, while it was not necessarily the case for RMS-bedded herds.

For the analyses related to the current article, all samples were collected on a farm visit held between January and July 2018. Procedures used for producing RMS were recorded. It is important to note that RMS farms produced the RMS through different protocols, involving some bedding maturation (Figure 1). Both used and unused RMS and straw samples were collected by the

research team. Unused bedding was sampled directly from the equipment before use and used bedding was sampled after use at the end of the use cycle (which varied from one farm to another) (Table 1-2), prior to replacement. Based on others sampling procedures, used bedding was sampled randomly from the back third surface of 5 stalls in each farm, while avoiding manure piles (Animal and Health Diagnostic Center, 2020). Bedding samples (from the 5 different stalls; 300 g) were then, mixed in a plastic bag Before some was immediately transferred in a 50 mL Falcon tube for transport purpose and was immediately plunged and kept in liquid nitrogen. From the 50 mL Falcon tube, 1 g was used for DNA extraction. Bedding materials contained in the plastic bag were stored on ice and used for classic microbiological analyses. The quantity of liquid nitrogen and ice was adapted depending time transport to preserved samples integrity. Samples (bags and Falcon tube) were brought back to the Faculty of Veterinary Medicine at Université de Montréal. Bedding sample bags were stored at -20°C for 3 months until further processed and bedding sample falcons, for the DNA extraction, were stored at -80°C for one year.

Microbiota Analysis by 16S Amplicon Sequencing

DNA Extraction. For extraction, 1 g of each sample was added to 5 mL of PBS (Oxoid Canada, Nepean, ON, Canada) in a filter bag and homogenized using a stomacher. The PBS solution, containing the bacteria detached from the bedding material was kept. This process was repeated 3 times. The total recovered PBS solution (approximately 15 mL) was centrifuged at 4°C for 20 min at 4700 g (Thermo Sorvall Legend X1, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). The pellet was used for DNA extraction. Genomic DNA extraction of all samples was performed with the Qiagen DNeasy® PowerSoil® Kit (Qiagen, Hilden, NW, Germany) as recommended by the manufacturer. Negative control (water) and positive control (ZymoBIOMICS™ Microbial

Community Standard (Zymo Research, Irvine, CA, USA)) were used. DNA concentration was measured with invitrogen QubitTM dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada). Each DNA sample was standardized to a concentration of 10 ng/μL. After standardization, the DNA was stored at -20°C until PCR amplification.

PCR Amplification. A 291 bp of the V4 region of the 16S rRNA genes from the total extracted DNA was amplified. PCR negative controls (water) and PCR positive controls (ZymoBIOMICSTM Microbial Community DNA Standard (Zymo Research)) were used. The amplification was conducted according to Illumina's "16S Metagenomic Sequencing Library Preparation" guide (Part # 1504423 Rev. B). The primers 515FP1-CS1F (5'-TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') and 806RP1-CS2R (5'-ACACTGACGACATGGTTCTACAGTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') were used (Caporaso et al., 2012). The PCR master mix for one reaction volume of 25 μL contained: Invitrogen Platinum SuperFi DNA polymerase (1X SuperFi buffer, 1X enhancers and 0.2 U/μL SuperFi Taq polymerase) (Thermo Fisher Scientific), 0.2 mM of dNTPs, 0.6 μM of each primer and 0.4 mg/mL BSA. In each well, 6 μL of DNA [2 ng/μL] was added and amplified according to the following program: initial denaturation at 95°C for 5 min, 23 cycles (30 s of denaturation at 95°C, 30 s annealing at 55°C and an elongation of 180 s at 72°C) and ended with a final elongation of 10 min at 72°C (Thibodeau et al., 2017). PCR amplification was confirmed by electrophoresis on 2% agarose gel.

Sequencing and Bioinformatics Analysis. The PCR products (samples, negative DNA extraction controls, negative PCR control, positive DNA extraction controls and positive PCR control) were sent to Génome Québec Inc. (Génome Québec inc., Montréal, QC, Canada) for Illumina MiSeq 2 x 250 pb sequencing. Reads were received in FastQ files from the sequencing

centre. Mothur version 1.43.0 was used for reads cleaning following the online MiSeq SOP (accessed February 2020) (Kozich et al., 2013). Briefly, for each sample, complementary sets of reads were combined. Sequences that were too long or contained ambiguities were discarded. Reads were aligned and classified using SILVA's database version 132 (Thibodeau et al., 2017). Then, similar sequences were regrouped with the deblur precluster method. Chimeras were removed, and reads were clustered into operational taxonomic units (OTU) with the "unique" option (Lariviere-Gauthier et al., 2017, Thibodeau et al., 2017). For analysis, reads were subsampled to the lowest numbers of reads found in a single sample.

Bacterial Analyses

Investigating for the Presence of Salmonella spp. Detection was made using 25 g of each bedding sample (used/unused RMS and straw). The methodology was based on a modified version of the ISO 6579:2002(E) and MFHPB-20 procedures previously used in our laboratory (Thibodeau et al., 2017). Briefly, *Salmonella* spp. detection was performed using a preincubation in buffered peptone water (Biokar diagnostic, Allonne, France) at 37°C for 18-24 h. Tetrathionate Brilliant Green Bile Broth (TBG) (BD Difco, Franklin Lakes, NJ, United States) and MSRV Agar medium (Biokar diagnostic) with novobiocin [20 mg/L] (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MI, USA) were used in parallel for the selective enrichment. TBG and MSRV were inoculated respectively with 1 mL and 3 spots of 100 µL of the preenrichment. They were incubated for 24 to 48 h at 42°C. Isolation was performed, in parallel, on BG Sulfa Agar Brilliant Green medium (BGS) (BD Difco™) for MSRV migration zone extremity and XLD medium (Biokar diagnostic) for incubated TBG, incubated at 37°C for 24h (Lebel et al., 2017).

One typical colony per plate (from BGS and XLD) were confirmed using TSI medium (BD Difco™), Urea Agar medium (BD BBL™, Mississauga, ON, Canada) and seroagglutination using

Salmonella O antiserum poly A-I factors 1-16 (Fisher scientific). Confirmed colonies were sent to the Animal Health Laboratory of the Quebec's Ministry of Agriculture, Fisheries, and Food (MAPAQ, Saint-Hyacinthe, QC, Canada) for serotyping (Table S1).

Investigating for the Presence of Listeria monocytogenes. Detection was made using the remaining 10 g of each sample (used/unused RMS and straw). This detection was performed with a modified version of the Rapid'*L.mono* method of BIO RAD (BIO RAD, 2014). A primary enrichment was first performed in modified UVM 1 broth (Biokar diagnostics) for 48 h at 30°C, secondary enriched (100 µL of UVM1) in Fraser broth (24 h at 37°C) (Biokar diagnostic). Then, Rapid'*L.mono* medium (BIO RAD, Marnes-la-Coquette, France) was inoculated with 100 µL of Fraser enrichment for 24 h at 37°C. Typical positive colonies (blue colonies) were purified on Tryptone Soya Agar medium with 5% sheep blood (24h at 37°C) (Oxoid).

Pure typical colonies of *Listeria monocytogenes* were confirmed by the rhamnose fermentation test (TCI AMERICA, Portland, OR, USA) in Remel Purple Broth Base medium (Thermo Fisher Scientific) as well as by multiplex PCR. For each suspected isolate, DNA was extracted with 50 µL of 10% Chelex® 100 Resin solution (BIO RAD). Samples were heated (30 min at 55°C followed by 15 min at 98°C) and centrifuged at 4°C for 5 min at 14000 rpm (Eppendorf Micro Centrifuge 5415 C, Brinkmann Instrument, Inc., Rexdale, On, Canada). The *prs* (370 bp) and *prfA* (274 bp) gene were amplified the primers LIP1, LIP2, prsF and prsR (K  rouanton et al., 2010). The reaction for one volume of 50 µL contained 1.0X reaction buffer, 2.0 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs mix, primers (Table S2), 1.0 U of polymerase and 2 µL of DNA [10 ng/µL]. PCR was performed using the Eppendorf Mastercycler® nexus (Eppendorf Canada, Mississauga, ON, Canada), using the following program: the lid temperature was set to 105°C, the first denaturation step was 3 min at 94°C and was followed by 35 PCR cycles consisting of denaturation (94°C for

40 s), annealing (53°C for 45 s) and extension (72°C for 1 min and 15 s). The final step was set at 72°C for 7 min and was held at 4°C (K  rouanton et al., 2010). Positive (*L. monocytogenes* ATCC 63253) and negative (*L. ivanovii* ATCC 19119 and water) controls were used. Electrophoresis on 2% agarose gel was performed with PCR products: 5   L of DNA products were mixed with 1   L of loading buffers. For assessing PCR amplicon size, Invitrogen 1Kb ladder (Thermo Fisher Scientific) was used. Gel migration was performed at 120 V for 35 mins. Bands were visualized under UV lamps with the used of SYBR   Safe DNA gel stain (Thermo Fisher Scientific).

Bacterial Counts of Mastitis Related Bacteria. A total of 10 g of overnight thawed bedding samples (again, used/unused RMS and straw), taken from different region of the plastic bag, was added to 90 mL tryptone-salt solution (1% tryptone and 8,5% sodium chloride) (tryptone and sodium chloride ordered from Thermo Fisher Scientific). Series of dilution (10^0 to 10^{-4}) were performed in tryptone-salt for each sample. Based on preliminary enumeration tests, dilutions 10^0 and 10^{-2} for unused straw and dilutions 10^{-2} and 10^{-4} for RMS samples (unused and used) as well as used straw were kept for enumeration with an Automatic Spiral   plater (Interscience, Saint-Nom-la-Bret  che, France). Each sample dilution was plated on Vogel and Johnson Agar (VJ) medium (BD Difco  ) with 1% tellurite solution (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MI, USA), MacConkey Agar medium (BD Difco  ), Edwards (Modified) medium (Oxoid Canada, Nepean, ON, Canada) with 5% of sheep defibrinated blood (Oxoid Canada) and Tryptone Soya Agar medium with 5% sheep blood (Oxoid). Those mediums were used for enumeration of *Staphylococcus* spp. (VJ), coliforms (MacConkey), *Streptococcus* spp (Edwards) and total mesophilic bacteria (TSA blood). Plates were incubated for 24 h at $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. Enumerations of colony forming units (CFU) were performed as recommended, using a count grid. *E. coli* and *Klebsiella* spp. were enumerated separately based on the CFU morphological appearance (pink to

red CFU on MacConkey were presumed to be *Klebsiella* spp.). To validate the accuracy of the morphological-based identification for separating *Klebsiella* from *E. coli* colonies, we further confirmed identification of 20 *E. coli* and 20 *Klebsiella* spp. isolates using Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight (Bruker LTD, Milton, ON, Canada). The morphological-based identification was correct for 100% of isolates tested. All enumeration results were transformed in log 10 CFU/g before statistical analyses and, for each sample and each media, the mean of the two enumerations was computed and used in subsequent statistical analyses.

Statistical Analyses.

Sequencing Analyses. Microbiota analysis was performed in RStudio (v. 1.2.5033) using R version 3.6.1. We used ggplot2, vegan, dplyr, scales, grid, reshape2, phyloseq, ape, gplots, lme4, phangorn, plotly, tidyr, VennDiagram, data.table and RColorBrewer packages. Mann and Whitney statistical test was performed to compare the mean relative abundances of the main phylum presented in the stack bar charts ($p < 0.05$). The numbers of OTUs observed, inverted Simpson's index and Shannon evenness were calculated. The results were compared between the previously mentioned groups using Kruskal-Wallis and Wilcoxon tests ($p < 0.05$). Beta diversity was analyzed by first looking at the microbiota structure using a distance matrix comparing all the samples and groups with the Jaccard and Bray-Curtis dissimilarity indexes. The results were visualized by using a non-metric multidimensional scaling graph (NMDS). Bedding types were compared using the ADONIS test. Venn diagram was constructed with a cut-off of 90% OTUs present in the bedding samples. The 90% cut-off represented conserved OTU if it was present in 90% of bedding sample category. This cut-off was used since a large amount of OTUs was found in bedding samples and we wanted to avoid OTUs that were found in only one sample.

Analyses of Data Related to Bacterial Counts and Presence of Zoonotic Pathogens.

Probability of recovering *Salmonella* spp. or *Listeria monocytogenes* in unused and used bedding was compared between RMS and straw-bedded herds. To achieve this Fisher exact tests were used.

Counts of *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Klebsiella* spp., *E. coli* and total mesophilic flora were compared between unused and used RMS, between unused and used straw, between unused RMS and unused straw, and, finally, between used RMS and straw. To achieve this, a linear regression model was developed for each bacterial group, with log 10 CFU/g of the bacterial group as the outcome and, as fixed predictors: type of bedding (RMS vs. straw), the status of the bedding (unused vs. used), and the interaction term between type of bedding and bedding status. Moreover, housing type (freestall vs. tie-stall) was included in the model as a fixed predictor, since it was hypothesized to act as a confounder of the relationship between bedding type and bacterial counts when comparing RMS to straw. When comparing the different groups, a Tukey-Kramer adjustment was used to take into account the multiple comparisons made. Assumptions of normality and homoscedasticity of the residuals were verified using visual inspection of a histogram of the residuals and of a scatter plot of the residuals against the predicted log 10 CFU/g values, respectively.

We then compared bacterial counts in unused RMS as a function of the method used to produce the RMS (separation only, separation followed by maturation in a drum, separation followed by maturation in a box, separation followed by maturation in a pile, or use of an anaerobic digester). Again, a linear regression model was applied, but strictly to RMS unused bedding data, and with count (in log 10 CFU/g) of a group of bacteria as outcomes and type of method used to

produce the RMS as fixed predictors. Adjustment for multiple comparisons was made and assumptions of the model were verified as described before.

RESULTS

Farm Recruitment and RMS Production

We recruited 27 RMS farms and 61 straw-bedded farms for the study ($n = 88$) (Table 1). Seventeen farms used a screw-press system for removing a fraction of the liquid from the solid part and 10 farms used a roller press system. One farm used the RMS immediately after the separation step, without further maturation. After liquid extraction, 26 farms let the RMS solid fraction mature before use: in a heap (10 farms), a box (13 farms) or a rotative drum (2 farms) (Table 1-2). One farm used an anaerobic digester. The maturation time varied from 9 h to 9 d except for the farm using anaerobic digestion, which was completed over 30 d. The time before RMS was added in the stalls varied between 0.14 to 4 times per day (24 h). The straw-bedded farms added the bedding 1 to 4 times per day (24 h) (Table 1-2).

Microbiota Description

A total of 10,044,820 sequences were retained after bioinformatics treatment with Mothur yielding a total of 117,545 unique sequences. Since we set the clustering methods to “unique”, each unique sequence was assigned to its own OTU. After bioinformatics treatment with RStudio, samples were normalizing to 18,950 sequences (size of the smallest sample). The maximum, median and mean number of sequences per sample was respectively 69,876, 54,060.5 and 53,785.28. The sequences and OTUs number of each controls are presented in Table 3. Venn diagrams were constructed to present the genus who were unique and shared between bedding

groups. To achieve this, the sequences were merged at the genus taxonomic rank, yielding a total of 3 712 different genera. Genus not present in at least 90% of bedding type were discarded. Therefore, 748 genera constituted the bedding microbiota, and the bedding core microbiota (shared by all types of bedding) was constituted by 303.

Unused Bedding Microbiota. Microbiota from unused RMS samples are compared to that of unused straw samples in Figure 2. The major phyla ($n = 28$) were presented both in unused RMS and straw samples, but different in different proportions. Effectively, most of the major phyla were presented with variable proportion (except for Actinobacteria phylum ($p = 0.25$)) confirming clear difference in phylum composition of respective microbiota between unused RMS and straw bedding. Unused RMS and straw samples were composed by Proteobacteria (RMS 38%; straw 69% ($p < 0.001$), Firmicutes (RMS 32%; straw 2% ($p < 0.001$)), Bacteroidetes (RMS 14%; straw 21% ($p = 0.007$)) and Actinobacteria (RMS 7%; straw 6% ($p = 0.25$); Figure 2). Also, we observed *Deinococcus-Thermus* (1%; 95% CI: 0.01% to 16%) in unused RMS, but not in unused straw (Figure 2A). At the genus level, we obtained a total of 861 genera in unused RMS and 870 genera in unused straw. Genus with a relative abundance $\geq 10\%$ are shown in Figure 3. Only *Pseudomonas* genus was present both in RMS and straw.

For alpha diversity, we observed differences between unused RMS and unused straw for all measured diversity indexes (Observed: $p < 0.001$; Shannon: $p < 0.001$; InvSimpson: $p = 0.017$; Figure 4A). In general, diversity was more important in unused RMS than in unused straw bedding. The beta diversity was also investigated and illustrated by non-metric multidimensional scaling plot (NMDS; Figure 4B) and the microbiota structure compared using Jaccard and Bray-Curtis index and the statistical ADONIS test. We observed that bedding type (unused RMS vs. unused straw) was associated with samples microbiota's structure ($p < 0.001$).

Moreover, table illustrating unique genera to a bedding type was constructed using Venn diagrams we observed 217 unique genera in unused RMS compared to 103 unique genera in straw (Tables S2). We observed higher unique genera in unused RMS samples compared to unused straw samples, but we observed 312 genera that were shared between the unused RMS and unused straw bedding samples (Tables S2).

We detected *Listeria monocytogenes* more frequently in unused RMS (30%; 95% CI: 15, 50%) compared to unused straw (11%; 95% CI: 5, 23%). Moreover, we detected *Salmonella* spp. (K serotype) in 11% (95% CI: 3, 30%) of unused RMS and in none of the unused straw samples.

We observed significant higher bacterial counts, in general, in unused RMS compared to unused straw, except for *Klebsiella* spp. counts (Table 4). Total mesophilic flora counts were estimated to be 0.9 log 10 CFU/g higher in unused RMS bedding than in unused straw. *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. and *Escherichia coli* counts were estimated to be, respectively, 2.6, 1.6, and 2.0 log 10 CFU/g higher in unused RMS bedding (Table 4). On the other hand, *Klebsiella* spp. counts were significantly lower in unused RMS samples by an average of 1.6 log 10 CFU/g (Table 4).

Used Bedding Microbiota. Microbiota of the samples originating from used RMS samples were compared to that of used straw samples (Figure 5). We observed 32 phyla in used RMS and 29 in used straw samples. Most phyla were observed with similar proportion in both used RMS and used straw. Used RMS and straw microbiota were mostly composed of Proteobacteria (RMS 53%; straw 46% ($p = 0.009$)), Bacteroidetes (RMS 25%; straw 22% ($p = 0.26$)), Firmicutes (RMS 10%; straw 20% ($p < 0.001$)) and Actinobacteria (RMS 8%; straw 10% ($p = 0.036$); Figure 6). Recycled manure solid was also composed of Deinococcus-Thermus (1%; 95% CI: 0.0001% to 22%; Figure 5A).

Moreover, we observe a total of 927 and 1054 genera respectively in used RMS and used straw samples. Genus with a relative abundance $\geq 10\%$ are illustrated in Figure 6. Briefly, *Acinetobacter*, *Flavobacteriaceae unclassified*, *Pseudomonas* and *Psychrobacter* genera were found both in used RMS and used straw bedding.

The alpha diversity was investigated, and we observed no differences in the different measures of diversity between used RMS and used straw (Observed: $p = 0.068$; Shannon: $p = 0.81$; InvSimpson: $p = 0.70$; Figure 4A). In used bedding samples, microbiota structure was associated with bedding type, similarly to what was observed in unused beddings ($p < 0.001$; Figure 4B).

Moreover, we observed 113 unique genera in used RMS compared to 136 in used straw and 390 genera were shared between used RMS and used straw (Table S4).

Moreover, we detected *Listeria monocytogenes* in 48% (95% CI: 29, 67%) of used RMS samples compared to 20% (95% CI: 11, 32%) of used straw samples. Also, *Salmonella* spp. (K, C1 and B serotype) was significantly detected more frequently in used RMS (15%; 95% CI: 5, 35%) than in used straw samples (2%; 95% CI: 0, 10%).

Regarding counts of udder health-related bacteria, we observed a higher total mesophilic flora bacterial count in used RMS (9.5 log 10 CFU/g; 95% CI: 9.2, 9.8) compared to used straw bedding (8.6 log 10 CFU/g; 95% CI: .4, 8.9) as well as higher *E. coli* counts (RMS: 5.4 log 10 CFU/g; 95% CI: 5.1, 5.7; straw: 4.6 log 10 CFU/g; 95% CI: 4.3, 4.9; Table 4). On the other hand, used straw samples had significantly higher *Streptococcus* spp. counts (7.4 log 10 CFU/g; 95% CI: 6.9, 7.8) than used RMS samples (6.2 log 10 CFU/g; 95% CI: 5.7, 6.8; Table 4). We did not observed substantial differences between used RMS and used straw bedding for *Staphylococcus* spp. (RMS: 7.0 log 10 CFU/g; 95% CI: 6.6, 7.4; straw: 6.8 log 10 CFU/g; 95% CI: 6.4, 7.1) nor for

Klebsiella spp. counts (RMS: 5.2 log 10 CFU/g; 95% CI: 4.8, 5.6; straw: 5.8 log 10 CFU/g; 95% CI: 5.5, 6.2; Table 4).

Evolution of Straw Microbiota with Usage. Microbiota in the samples originating from unused straw were compared to that of used straw to described evolution of the microbiota during usage. We observed 31 phyla in unused straw and 29 phyla in used straw samples. Twenty-eight phyla were shared by unused and used straw samples. Proteobacteria phylum relative abundance was greater in unused straw (69% in unused vs. 46% in used straw bedding; ($p < 0.001$)), but Actinobacteria and Firmicutes phyla were more associated to used straw (20% and 10%, respectively; $p < 0.001$; $p < 0.001$) compared to unused straw (6% and 2%, respectively). At genus level, we observed a total of 870 genera in unused straw samples and a total of 1054 genera in used straw samples. Among genus with relative abundance $\geq 10\%$, we noticed 6 genera that were common to unused and used straw samples. These genera were *Chryseobacterium*, *Pantoea*, *Pedobacter*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* and *Xanthomonas*.

We observed a greater alpha diversity in used straw bedding samples, compared to unused straw samples (Observed: $p < 0.001$; Shannon: $p < 0.001$; InvSimpson: $p < 0.001$; Figure 4A). Regarding beta diversity, we observed significant difference in the microbiota structure between unused and used straw ($p < 0.001$; Figure 4B).

Regarding genus-level data, using the Venn diagrams, we observed 390 common genera between unused and used straw samples, 25 unique genera in unused straw and 209 unique genera in used straw samples (Table S5). We observed a higher presence of unique genera in used straw than in unused straw samples.

Finally, we observed that the used straw samples had significantly higher bacterial count than unused straw samples for all bacterial groups, with differences ranging between 0.5 log 10 CFU/g (for to *Klebsiella* spp.) to 4.0 log 10 CFU/g (for *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp.; Table 4).

Evolution of RMS Microbiota with Usage. Microbiota in the samples originating from the unused RMS samples were compared to the one from used RMS samples. We observed that 30 phyla were common to unused and used RMS samples. The relative abundance of Firmicutes was significantly greater in unused RMS compared to used RMS samples. On the other hand, Proteobacteria and Bacteroidetes relative abundance was greater in used than in unused RMS samples ($p = 0.001$; $p < 0.001$). To genera level, used RMS contained more genera (927) compared to unused RMS (861) samples. Among genus with a relative abundance $\geq 10\%$, we noticed the presence of 6 common genera to unused and used RMS samples. These genera were: *Acinetobacter*, *Cellvibrio*, *Flavobacterium*, *Luteimonas*, *Pseudomonas* and *Symbiobacterium*.

Alpha diversity was lower in in unused RMS compared to used RMS samples (Observed: $p < 0.001$; Shannon: $p = 0.005$; InvSimpson: $p = 0.012$; Figure 4A). Moreover, we observed a difference between unused and used RMS regarding the structure of the microbiota ($p < 0.001$; Figure 4B).

Four hundred ninety-five genera were common to unused and used RMS, 34 unique genera were found in unused RMS and 81 unique genera in used RMS (Table S6).

Listeria monocytogenes was detected in 30% (95% CI: 15, 50) of unused RMS samples and in 48% (95% CI: 29, 68) of used RMS beddings. *Salmonella* spp. were found in 11% (95% CI: 3,

30) of unused RMS samples and in 15% (95% CI: 5, 35) of used RMS samples. The differences between unused and used RMS bedding regarding pathogen detection were not significant.

Finally, we observed larger counts of bacteria, in general, in used RMS samples compared to unused samples with differences ranging from differences of 1.0 log 10 CFU/g (for *E. coli*) to differences of 1.6 log 10 CFU/g (for *Staphylococcus* spp.; Table 4).

Influence of Method of Preparation on Recycled Manure Solids Unused Bedding's Microbiota. Finally, the microbiota in the samples originating from the unused RMS samples and produced using different production systems were compared. Among the 27 RMS herds, 5 RMS production methods were used: separation followed with maturation in a rotative drum (S-CRD; n=2), anaerobic digestion (AD; n=1), separation followed with maturation in a heap (S-MH; n=10), separation with maturation in a box (S-MB; n=13) and separation only (S, n=1). Due to the low number of S-CRD, AD and S production systems, and the resulting low statistical power for highlighting differences between systems, we focused mainly on the S-MH and S-MB production system for the microbiota comparisons. We observed the same phyla in each production methods with no significant different relative abundance (Figure 7A). As mentioned above, unused RMS microbiota was composed by a total of 864 genera, but the RMS production system were composed by 13 genera with an abundance filter set to 0.10. We observed that both S-BM and S-MH production systems were associated with a high proportion of *Acinetobacter* genus in RMS, and with unclassified *Bacillales* for S-MH (Figure 7B).

We observed no significant difference in alpha diversity for any of the diversity indices between the different production groups (Observed: $p = 0.94$; Shannon: $p = 0.65$; InvSimpson: $p = 0.92$; Figure 8A). The microbiota structure, however, was affected by the production methods ($p < 0.01$; Figure 8B).

For comparing genus composition of the different RMS production systems, we obtained a total of 804 genera. Genus not present in at least in 90% samples (10 S-MH and 13 S-MB) were discarded. The core microbiota shared by bedding from the two productions systems was constituted by 275 genera, while 4 unique genera were found in S-MB production system and 15 unique genera in samples from the S-MH production system (Table S7).

Listeria monocytogenes was detected in 55% (95% CI: 25, 82) of unused RMS samples produced using a S-MB system and in 20% (95% CI: 4, 56) of samples produced using a S-MH system. Also, we observed that *Salmonella* spp. was detected in 100% (95% CI: 95, 100%) of unused RMS samples produced using a S-MB system compared to none (95% CI: 0, 34%) in samples produced using a S-MH system.

Least square means estimates of bacterial counts in unused RMS bedding and as function of production system are reported in Table 5. Briefly, total mesophilic counts were greater in RMS samples produced using maturation in a box (8.5 log 10 CFU/g; 95% CI: 7.9, 9.0) compared to samples produced using a rotative drum (6.0 log 10 CFU/g; 95% CI: 4.7, 7.4; Table 5). Streptococci and *E.coli* counts were also higher in samples obtained using maturation in a box (streptococci: 5.7 log 10 CFU/g; 95% CI: 5.1, 6.4; *E. coli*: 4.9 log 10 CFU/g; 95% CI: 4.6, 5.3) compared to maturation in heaps (streptococci: 4.3 log 10 CFU/g; 95% CI: 3.5, 5.0; *E. coli*: 4.2 log 10 CFU/g; 95% CI: 3.8, 4.6; Table 5).

DISCUSSION

The use of RMS is an alternative solution to classical bedding with straw for dairy cows and benefits have been reported such as: increased comfort, reduced hock lesions, and improved

cleanliness of dairy cows (Green et al., 2014, Bradley et al., 2018, Fournel et al., 2019b). On the other hand, little data on RMS microbiota and pathogens detection are available in eastern Canada. Some studies have described the fecal microbial community in dairy cows and its impact on soil microbiota (Chen et al., 2019, Guron et al., 2019, Hagey et al., 2019). However, no study has described the microbiota of used and unused RMS and straw on dairy farms. Therefore, the present study compared different bedding type in eastern Canada dairy farms.

Alpha diversity analyses indicated that diversity was more important in unused RMS compared to unused straw. A higher presence of unique genera in unused RMS compared to unused straw confirmed this higher microbiota diversity.

Moreover, our NMDS analyses illustrated a separation between unused RMS and unused straw bedding samples. Those differences in diversity, both alpha and beta, can be explained by the origin and by the physicochemical properties of the different bedding types. Effectively, RMS bedding quality can be influenced by temperature, humidity, pH, oxygen/nitrogen percentage and by the farm (Hanajima et al., 2011, Pandey et al., 2018, Meng et al., 2019). Straw bedding can be influenced by geographical location, humidity, or separation methods (Djemiel et al., 2017, Tang et al., 2017). In our study, the size of dairy herds were variables (Table 1). Those size differences could impact the RMS production. Herds with more than 100 dairy cows need more bedding material than herd with only 60 dairy cows. The size of RMS production could possibly impact on microbiological population. The frequency of manure removal and bedding adding could impact on the microbiological population in RMS and straw bedding. Effectively, an accumulation of manure could increase the humidity of bedding and a bigger time between removal feces contamination could increase microbial population or diversity.

Unused RMS was constituted by undigested vegetal fibres that are similar, to some point, to straw (Godbout et al., 2019). We observed that unused RMS and unused straw possessed mostly the same main phyla but with different proportions. We observed, in unused RMS, that the main phyla were Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria and Deinococcus-Thermus. These phyla were also found in the dairy fecal microbiota (Rice et al., 2012, Hagey et al., 2019). Before the used of the RMS, this bedding type already possessed the phyla contained in manure to a much greater extend then unused straw bedding. The Firmicutes and Bacteroidetes were associated to dominant phyla and Proteobacteria and Actinobacteria were associated to minor contributing phyla according to a study on the microbiota of dairy cow feces (Hagey et al., 2019). We also obtained the same dominant phyla (Firmicutes and Bacteroidetes) in RMS bedding, but Proteobacteria was associated to dominant phylum comparatively to the study from Hagey et al. (2019).

The unused straw was mainly composed of Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria and Firmicutes. These phyla were found in other straw microbiota studies but with different relative abundances (Liu et al., 2016, Jin et al., 2018, Yang et al., 2019). This difference could be explained by the straw origin, soil or climate related parameters.

Microbiota of unused RMS and used RMS were similar as illustrated by the NMDS and this is striking when compared to unused and used straw. Unused RMS formed a different group from used RMS, but the two showed a large overlap compared to unused and used straw who formed two distinct groups. This result was confirmed with the Venn analysis where 495 OTUs were common between unused RMS and used RMS with only 34 genera unique to unused RMS and 81 to used RMS. These results illustrated that unused RMS and used RMS were similar and usage (i.e., mainly adding urine and fecal contamination) do not have a major impact on the

microbiota diversity, which was the opposite of what could be observed for straw. Microbiota diversity did not increase with the fecal contamination in bedding. Phyla found in the analysed RMS samples were also found in a composting manure microbiota study (Zhong et al., 2020). The microbiota diversity were similar in unused and used RMS. If some phyla were found in the composting microbiota, a question arise: What will happen if we recycle indefinitely the RMS bedding? After use, the manure and RMS contaminated with feces or urine will be collected and the RMS production process will run again (Figure 1) (Leach et al., 2015, Fournel et al., 2019a, Fournel et al., 2019b). We can hypothesis that RMS microbiota diversity will tend to be stabilised and will stay the same.

We also detected equivalent bacterial count level for total mesophilic flora, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., coliforms, *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli* in unused RMS compared to other studies. For used RMS bacterial count, our results were higher by 1 log 10 CFU/g than other studies (Leach et al., 2015, Patel et al., 2019, Rowe et al., 2019). This can possibly be explained by the different environmental conditions between Canada and the US or the UK and the time when bedding was sampled (winter vs. summer) (Okamoto et al., 2018).

Recently, Lasprilla-Mantilla et al., (2019) demonstrated that *Cryptosporidium* spp., a zoonotic microorganism, was not affected by RMS production methods used in Eastern Canadian dairy farms. Indeed, they found that a higher proportion of RMS farms were positive (85%), compared to farms using straw (49%) and suggested that the use of RMS could promote within herd transmission. This suggests that other zoonotic pathogens could be present in RMS. Indeed, we detected the presence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in unused RMS. A recent study reported the presence of *E. coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* in the feces of several farms in the USA (Hagey et al., 2019), highlighting the need of a RMS maturation process that should

completely eliminate these zoonotic pathogens, which was clearly not the case for the majority of RMS samples analysed in our study. Several maturation processes exist as anaerobic digester, drum composter, close container «in-vessel», maturation in a box or in a heap. It can involve thermophilic microorganisms allowing pathogens destruction. Maturation can increase temperature for maximal pathogens destruction, microbial stabilization and moisture reduction (Fournel et al., 2019a). Close and ventilated enclosures seem to be interesting because they allow a rigorous control of maturation parameters. They can obtain uniform thermophilic treatment and year-round production with consistent bedding quality. Chemical conditioner, such as alkaline conditioner, can reduce bacteria counts in recycled manure and can be another option to maturation (Hogan et al., 1999).

We also found that the RMS type of production system impacted the pathogens presence and microbiota structure. A study on composting also observed that the different composting steps (active step and maturation step) can impact on microbiota composition (Zhong et al., 2020). According to other recent articles, the farm origin, the farm housing type, the manure state and the different phases of composting can impact the bacterial communities in dairy manure (Pandey et al., 2018, Hagey et al., 2019, Zhong et al., 2020). In our study, heap matured RMS samples possessed lower bacterial counts than box matured samples. According to the Ministry of Sustainable Development, Environment and the fight against climate change standards for an efficient pathogen destruction, compost needs to reach 55 °C or more during at least 3 days in the active composting phase and needs to be turned frequently for a proper oxygen introduction (Misra et al., 2005, Bernal et al., 2009, Ministère du Développement durable, 2018). These criteria could be implemented as critical control points for the on-farm production of RMS.

CONCLUSIONS

In conclusion, the RMS microbiota was different compared to straw and the method for producing the RMS clearly impacted its quality. In our study, RMS heap production appeared to be a better option for RMS maturation than RMS produced using maturation in a box, since it contained lower bacterial load and *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. were less frequent isolated. Nevertheless, this study clearly indicated that the microbial quality of RMS, in general, is inferior to straw bedding, the most common bedding used in Eastern Canada. The RMS bedding currently produced on farms in Eastern Canada, clearly constitute a greater microbiological risk as compared to straw bedding.

ACKNOWLEDGMENTS

This project was found by the Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG; grant #: CRDPJ-499421-16), the Fonds de recherche du Québec-Nature et technologies (FQRNT; grant #: 2017-LG-201835), the Consortium de recherche et innovations en bioprocédés industriels au Québec (CRIBIQ; grant #: 2015-044-C17) and Novalait Inc (grant #: RB002525). The authors would like to thank the Op+Lait research group for the exchange of ideas that led to the conception of this project, Annie Fréchette and Caroline Forest (Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Canada) for the farms visits and bedding samples and Génome Québec for sample sequencing. A special thanks to all members of the CRSV team for their scientific advice and technical assistance, particularly to William Thériault for protocol and technical help.

REFERENCES

- Animal and Health Diagnostic Center. 2020. How to Collect Bedding Samples. C. o. V. M. Cornell University, ed. Cornell University, College of Veterinary Medicine, New York.
- Bernal, M. P., J. A. Albuquerque, and R. Moral. 2009. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresource Technology* 100(22):5444-5453. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.11.027>.
- BIO RAD. 2014. RAPID'L.mono/Agar. Pages 1-7. Vol. 2. BIO RAD, ed. BIO RAD,.
- Bradley, A. J., K. A. Leach, M. J. Green, J. Gibbons, I. C. Ohnstad, D. H. Black, B. Payne, V. E. Prout, and J. E. Breen. 2018. The impact of dairy cows' bedding material and its microbial content on the quality and safety of milk – A cross sectional study of UK farms. *International Journal of Food Microbiology* 269:36-45. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.022>.
- Caporaso, J. G., C. L. Lauber, W. A. Walters, D. Berg-Lyons, J. Huntley, N. Fierer, S. M. Owens, J. Betley, L. Fraser, M. Bauer, N. Gormley, J. A. Gilbert, G. Smith, and R. Knight. 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal* 6(8):1621-1624. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>.
- Carroll, E. J. and D. E. Jasper. 1978. Distribution of Enterobacteriaceae in Recycled Manure Bedding on California Dairies¹. *Journal of Dairy Science* 61(10):1498-1508. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(78\)83754-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(78)83754-0)
- Chen, Z., W. Zhang, L. Yang, R. D. Stedtfeld, A. Peng, C. Gu, S. A. Boyd, and H. Li. 2019. Antibiotic resistance genes and bacterial communities in cornfield and pasture soils receiving swine and dairy manures. *Environmental Pollution* 248:947-957. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.093>.

Cole, K. J. and J. S. Hogan. 2016. Short communication: Environmental mastitis pathogen counts in freestalls bedded with composted and fresh recycled manure solids. *Journal of Dairy Science* 99(2):1501-1505. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10238>.

Djemiel, C., S. Grec, and S. Hawkins. 2017. Characterization of Bacterial and Fungal Community Dynamics by High-Throughput Sequencing (HTS) Metabarcoding during Flax Dew-Retting. *Frontiers in microbiology* 8:2052-2052. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02052>.

Dufour, S., H. W. Barkema, L. DesCôteaux, T. J. DeVries, I. R. Dohoo, K. Reyher, J.-P. Roy, and D. T. Scholl. 2010. Development and validation of a bilingual questionnaire for measuring udder health related management practices on dairy farms. *Preventive Veterinary Medicine* 95(1):74-85. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.02.018>.

Fournel, S., S. Godbout, P. Ruel, A. Fortin, K. Duquette-Lozeau, V. Létourneau, M. Généreux, J. Lemieux, D. Potvin, C. Côté, C. Duchaine, and D. Pellerin. 2019a. Production of recycled manure solids for use as bedding in Canadian dairy farms: II. Composting methods. *Journal of Dairy Science* 102(2):1847-1865. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14967>.

Fournel, S., S. Godbout, P. Ruel, A. Fortin, M. Généreux, C. Côté, C. Landry, and D. Pellerin. 2019b. Production of recycled manure solids for bedding in Canadian dairy farms: I. Solid-liquid separation. *Journal of Dairy Science* 102(2):1832-1846. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14966>.

Gagnon, M., L. Hamelin, A. Fréchette, S. Dufour, and D. Roy. 2020. Effect of recycled manure solids as bedding on bulk tank milk and implications for cheese microbiological quality. *Journal of Dairy Science* 103(1):128-140. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16812>.

Godbout, S., S. Adam, L. Belzile, P. Brassard, L. Chauveau, C. Côté, C. Duchaine, S. Dufour, K. Duquette-Lozeau, G. Fecteau, S. Fournel, M. Généreux, D. Godonou, C. Landry, V. Létourneau, A. Lévesque, S. Ouslati, D. Potvin, P. Ruel, and M. Villettaz-Robichaud. 2019. Litière

recyclée en production laitière - État des connaissances et balises. I. d. r. e. d. d. e. a. Centre de recherche en sciences animales de Deschambault, Université Laval, ed. Centre de recherche en sciences animales de Deschambault, Institut de recherche et de développement en agroenvironnement, Université Laval, Québec.

Godden, S., R. Bey, K. Lorch, R. Farnsworth, and P. Rapnicki. 2008. Ability of Organic and Inorganic Bedding Materials to Promote Growth of Environmental Bacteria. *Journal of Dairy Science* 91(1):151-159. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0415>.

Green, M., K. A. Leach, J. Breen, I. Ohnstad, S. Tuer, S. Archer, and A. Bradley. 2014. Recycled manure solids as bedding for dairy cattle: A scoping study. *Cattle Practice* 22:207-214.

Guron, G. K. P., G. Arango-Argoty, L. Zhang, A. Pruden, and M. A. Ponder. 2019. Effects of Dairy Manure-Based Amendments and Soil Texture on Lettuce- and Radish-Associated Microbiota and Resistomes. *mSphere* 4(3):e00239-00219. DOI: 10.1128/mSphere.00239-19.

Hagey, J. V., S. Bhatnagar, J. M. Heguy, B. M. Karle, P. L. Price, D. Meyer, and E. A. Maga. 2019. Fecal Microbial Communities in a Large Representative Cohort of California Dairy Cows. *Frontiers in Microbiology* 10(1093). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01093>.

Hanajima, D., Y. Fukumoto, T. Yasuda, K. Suzuki, K. Maeda, and R. Morioka. 2011. Bacterial community dynamics in aerated cow manure slurry at different aeration intensities. *Journal of Applied Microbiology* 111(6):1416-1425. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05151.x>.

Hogan, J. S., V. L. Bogacz, L. M. Thompson, S. Romig, P. S. Schoenberger, W. P. Weiss, and K. L. Smith. 1999. Bacterial counts associated with sawdust and recycled manure bedding treated with commercial conditioners. *Journal of dairy science* 82(8):1690-1695.

Jin, W., Y. Wang, Y. Li, Y. Cheng, and W. Zhu. 2018. Temporal changes of the bacterial community colonizing wheat straw in the cow rumen. *Anaerobe* 50:1-8. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.01.004>.

K  rouanton, A., M. Marault, L. Petit, J. Grout, T. T. Dao, and A. Brisabois. 2010. Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping. *Journal of Microbiological Methods* 80(2):134-137. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.11.008>.

Kozich, J. J., S. L. Westcott, N. T. Baxter, S. K. Highlander, and P. D. Schloss. 2013. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol* 79(17):5112-5120. 10.1128/AEM.01043-13.

Lariviere-Gauthier, G., A. Thibodeau, A. Letellier, E. Yergeau, and P. Fravallo. 2017. Reduction of Salmonella Shedding by Sows during Gestation in Relation to Its Fecal Microbiome. *Frontiers in Microbiology* 8. 10.3389/fmicb.2017.02219.

Lasprilla-Mantilla, M. I., V. Wagner, J. Pena, A. Frechette, K. Thivierge, S. Dufour, and C. Fernandez-Prada. 2019. Effects of recycled manure solids bedding on the spread of gastrointestinal parasites in the environment of dairies and milk. *Journal of Dairy Science* 102(12):11308-11316. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16866>.

Leach, K. A., S. C. Archer, J. E. Breen, M. J. Green, I. C. Ohnstad, S. Tuer, and A. J. Bradley. 2015. Recycling manure as cow bedding: Potential benefits and risks for UK dairy farms. *The Veterinary Journal* 206(2):123-130. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.08.013>.

Lebel, P., A. Letellier, J. Longpr  , B. Laplante, E. Yergeau, and P. Fravallo. 2017. Feed presentation options in Swine early fattening mitigates Salmonella shedding and specifically

modulates the faecal microbiota. *Journal of Applied Microbiology* 122(1):30-39. <https://doi.org/10.1111/jam.13305>.

Liu, J., M. Zhang, C. Xue, W. Zhu, and S. Mao. 2016. Characterization and comparison of the temporal dynamics of ruminal bacterial microbiota colonizing rice straw and alfalfa hay within ruminants. *Journal of Dairy Science* 99(12):9668-9681. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11398>.

Meng, Q., W. Yang, M. Men, A. Bello, X. Xu, B. Xu, L. Deng, X. Jiang, S. Sheng, X. Wu, Y. Han, and H. Zhu. 2019. Microbial Community Succession and Response to Environmental Variables During Cow Manure and Corn Straw Composting. *Frontiers in Microbiology* 10(529). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00529>.

Ministère du Développement durable, d. l. E. e. d. l. L. c. l. c. c. 2018. Lignes directrices pour l'encadrement des activités de compostage. Gouvernement du Québec, ed. Gouvernement du Québec,, Québec.

Misra, R. V., R. N. Roy, and H. Hiraoka. 2005. Méthode de compostage au niveau de l'exploitation agricole. in Documents de Travail sur les Terres et les Eaux. Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture, ed. Food and Agriculture Organisation (FAO), Rome.

Okamoto, E., H. Miyanishi, A. Nakamura, T. Kobayashi, N. Kobayashi, Y. Terawaki, and H. Nagahata. 2018. Bacteriological evaluation of composted manure solids prepared from anaerobic digested slurry for hygienic recycled bedding materials for dairy cows. *Animal Science Journal* 89(4):727-732. <https://doi.org/10.1111/asj.12962>.

Pandey, P., C. Chiu, M. Miao, Y. Wang, M. Settles, N. S. del Rio, A. Castillo, A. Souza, R. Pereira, and R. Jeannotte. 2018. 16S rRNA analysis of diversity of manure microbial community in dairy farm environment. *PLOS ONE* 13(1):e0190126. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190126>.

Patel, K., S. M. Godden, E. Royster, B. A. Crooker, J. Timmerman, and L. Fox. 2019. Relationships among bedding materials, bedding bacteria counts, udder hygiene, milk quality, and udder health in US dairy herds. *Journal of Dairy Science* 102(11):10213-10234. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16692>.

Rice, W. C., M. L. Galyean, S. B. Cox, S. E. Dowd, and N. A. Cole. 2012. Influence of wet distillers grains diets on beef cattle fecal bacterial community structure. *BMC Microbiology* 12(1):25. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-25>.

Robles, I., D. F. Kelton, H. W. Barkema, G. P. Keefe, J. P. Roy, M. A. G. von Keyserlingk, and T. J. DeVries. 2020. Bacterial concentrations in bedding and their association with dairy cow hygiene and milk quality. *animal* 14(5):1052-1066. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002787>.

Rowbotham, R. F. and P. L. Ruegg. 2016a. Associations of selected bedding types with incidence rates of subclinical and clinical mastitis in primiparous Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science* 99(6):4707-4717. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10674>.

Rowbotham, R. F. and P. L. Ruegg. 2016b. Bacterial counts on teat skin and in new sand, recycled sand, and recycled manure solids used as bedding in freestalls. *Journal of Dairy Science* 99(8):6594-6608. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10675>.

Rowe, S. M., S. M. Godden, E. Royster, J. Timmerman, B. A. Crooker, and M. Boyle. 2019. Cross-sectional study of the relationships among bedding materials, bedding bacteria counts, and intramammary infection in late-lactation dairy cows. *Journal of Dairy Science* 102(12):11384-11400. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17074>.

Tang, M. T., H. Han, Z. Yu, T. Tsuruta, and N. Nishino. 2017. Variability, stability, and resilience of fecal microbiota in dairy cows fed whole crop corn silage. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101(16):6355-6364. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8348-8>.

Thibodeau, A., A. Letellier, É. Yergeau, G. Larrivière-Gauthier, and P. Fravalo. 2017. Lack of Evidence That Selenium-Yeast Improves Chicken Health and Modulates the Caecal Microbiota in the Context of Colonization by *Campylobacter jejuni*. *Frontiers in Microbiology* 8(451). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00451>.

Yang, H., J. Ma, Z. Rong, D. Zeng, Y. Wang, S. Hu, W. Ye, and X. Zheng. 2019. Wheat Straw Return Influences Nitrogen-Cycling and Pathogen Associated Soil Microbiota in a Wheat–Soybean Rotation System. *Frontiers in Microbiology* 10(1811). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01811>.

Zhong, X., X. Li, Y. Zeng, S. Wang, Z.-Y. Sun, and Y.-Q. Tang. 2020. Dynamic change of bacterial community during dairy manure composting process revealed by high-throughput sequencing and advanced bioinformatics tools. *Bioresource Technology* 306:123091. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123091>.

Tables

Table 1. Bedding samples descriptions

Farm #	Location	Bedding type	Housing type	Dairy cow number	Manure removal frequency (number of time / day)	Bedding addition frequency (number of time / day)	Maturation type	Maturation time (h)
1	Quebec	RMS	Free	115	4.5	27	Box	96
2	Quebec	RMS	Tied	68	2	2	Box	84
3	Quebec	RMS	Free	98	2	0.14	Heap	96
4	Quebec	RMS	Free	61	4	0.5	Box	36
5	Quebec	RMS	Free	214	3	1	Box	9
6	Quebec	RMS	Tied	239	8	2	Box	72
7	Quebec	RMS	Free	210	3	0.28	Heap	96
8	Quebec	RMS	Free	55	2	0.14	Heap	168
9	Quebec	RMS	Free	68	4	4	-	-
10	Quebec	RMS	Free	69	2	1	Box	24
11	Quebec	RMS	Free	128	2	0.43	Heap	48
12	Quebec	RMS	Tied	75	6	2	Box	72
13	Quebec	RMS	Free	900	3	1	Rotative Drum	48
15	Quebec	RMS	Tied	120	12	2	Heap	60
16	Ontario	RMS	Tied	74	5	2	Box	60
17	Ontario	RMS	Tied	100	3	2	Rotative Drum	48
18	Ontario	RMS	Free	160	2	0.5	Anaerobic Digester	720
19	Quebec	RMS	Free	230	3	0.14	Heap	216
20	Quebec	RMS	Free	111	1	0.14	Heap	84
21	Quebec	RMS	Tied	150	3	2	Box	96

22	Quebec	RMS	Free	200	3	1	Box	18
23	Quebec	RMS	Free	90	2	0.5	Heap	36
24	Quebec	RMS	Free	231	3	0.5	Heap	12
25	Quebec	RMS	Free	280	3	0.29	Heap	84
26	Quebec	RMS	Free	108	6	2	Box	48
27	Quebec	RMS	Free	110	2	1	Box	15
28	Quebec	RMS	Free	55	4	1	Box	24
30	Quebec	Straw	Tied	55	2	2	-	-
31	Quebec	Straw	Tied	70	6	1	-	-
32	Quebec	Straw	Tied	44	6	2	-	-
33	Quebec	Straw	Tied	58	3	2	-	-
34	Quebec	Straw	Tied	44	3.5	2	-	-
35	Quebec	Straw	Tied	65	9	2	-	-
36	Quebec	Straw	Tied	50	4.5	2	-	-
37	Quebec	Straw	Tied	64	5	2	-	-
38	Quebec	Straw	Tied	131	4	1	-	-
39	Quebec	Straw	Tied	72	3	1	-	-
40	Quebec	Straw	Tied	70	3	2	-	-
41	Quebec	Straw	Tied	229	3	2	-	-
42	Quebec	Straw	Tied	47	5	1	-	-
43	Quebec	Straw	Tied	81	5	1	-	-
44	Quebec	Straw	Tied	95	6	2	-	-
45	Quebec	Straw	Tied	64	5	1	-	-
46	Quebec	Straw	Free	59	5	1	-	-
47	Quebec	Straw	Tied	51	10	2	-	-
48	Quebec	Straw	Tied	65	3	2	-	-
49	Quebec	Straw	Tied	51	10	2	-	-
50	Quebec	Straw	Tied	76	3	2	-	-
51	Quebec	Straw	Tied	70	4	3	-	-
52	Quebec	Straw	Tied	110	4	2	-	-
53	Quebec	Straw	Tied	84	6	2	-	-
54	Quebec	Straw	Tied	60	4	3.5	-	-
55	Quebec	Straw	Tied	46	8	2	-	-

56	Quebec	Straw	Tied	98	6	2	-	-
57	Quebec	Straw	Tied	44	5	2	-	-
58	Quebec	Straw	Tied	60	12	2	-	-
59	Quebec	Straw	Tied	69	10	2	-	-
60	Quebec	Straw	Tied	75	6	2	-	-
61	Quebec	Straw	Free	117	2	1	-	-
62	Quebec	Straw	Tied	94	7	2	-	-
63	Quebec	Straw	Tied	54	10	2	-	-
64	Quebec	Straw	Tied	62	8	2	-	-
65	Quebec	Straw	Tied	75	2	2	-	-
66	Quebec	Straw	Tied	46	8	2	-	-
67	Quebec	Straw	Tied	80	10	1	-	-
68	Quebec	Straw	Tied	64	4	1	-	-
69	Quebec	Straw	Tied	68	5	2	-	-
70	Quebec	Straw	Tied	53	3	2	-	-
71	Quebec	Straw	Tied	51	4	2	-	-
72	Quebec	Straw	Tied	70	2	2	-	-
73	Quebec	Straw	Tied	60	5	2	-	-
74	Quebec	Straw	Tied	57	5	1	-	-
75	Quebec	Straw	Tied	65	6	2	-	-
76	Quebec	Straw	Tied	72	12	2	-	-
77	Quebec	Straw	Tied	58	3	2	-	-
78	Quebec	Straw	Tied	54	4	1	-	-
79	Quebec	Straw	Tied	114	4	2	-	-
80	Quebec	Straw	Tied	98	5	2	-	-
81	Quebec	Straw	Tied	66	3	2	-	-
82	Quebec	Straw	Tied	55	5	4	-	-
83	Quebec	Straw	Tied	58	6	2	-	-
84	Quebec	Straw	Tied	45	10	2	-	-
85	Quebec	Straw	Tied	75	5	2	-	-
86	Quebec	Straw	Tied	82	10	1	-	-
87	Quebec	Straw	Tied	50	3	2	-	-
88	Quebec	Straw	Tied	95	10	2	-	-

89	Quebec	Straw	Tied	43	5	4	-	-
90	Quebec	Straw	Tied	83	4	2	-	-

Table 2. Mean, SD and proportion of bedding description

Bedding type	Free stalls proportion (%)	Mean \pm SD (median) dairy cows number	Mean \pm SD (median) manure removal (number of time / day)	Mean \pm SD (median) bedding addition (number of time / day)	Maturation type proportion (Box / Heap / Rotative Drum) (%)	Mean \pm SD (median) maturation time
RMS	74.1	159,96 \pm 161.91 (111)	3.58 \pm 2.32 (3)	3.13 \pm 6.21 (2)	Box: 48.1 Heap: 37.0 Rotative Drum: 7.4 Anaerobic Digester: 3.7	87.78 \pm 135.10 (60)
Straw	4.9	70.8 \pm 28.41 (65)	5.61 \pm 2.68 (5)	1.87 \pm 0.60 (2)	-	-

Table 3. Sequences and OTUs number in positives and negatives controls

Controls	Sequences number	OTUs number
PCR negative	184	35
DNA extraction negative 1	9658	850
DNA extraction negative 2	88	15
PCR Zymo positive	54,456	286
DNA extraction zymo positive1	53,587	168
DNA extraction zymo positive 2	47,936	212

Table 4. Least square means estimated bacterial counts for different groups of bacteria, in unused and used recycled manure solids (RMS) and straw.

Bacterial group	Status	RMS		Straw	
		Log CFU/g [*]	95% CI	Log CFU/g [*]	95% CI
Total mesophilic flora	Unused	8.0 ^a	7.7, 8.3	7.1 ^b	6.8, 7.4
	Used	9.5 ^c	9.2, 9.8	8.6 ^d	8.4, 8.9
Staphylococci	Unused	5.4 ^a	5.0, 5.8	2.8 ^b	2.4, 3.1
	Used	7.0 ^c	6.6, 7.4	6.8 ^c	6.4, 7.1
Streptococci	Unused	5.0 ^a	4.5, 5.5	3.4 ^b	3.0, 3.9
	Used	6.2 ^c	5.7, 6.8	7.4 ^d	6.9, 7.8
<i>E. coli</i>	Unused	4.4 ^a	4.1, 4.7	2.4 ^b	2.1, 2.7
	Used	5.4 ^c	5.1, 5.7	4.6 ^a	4.3, 4.9
<i>Klebsiella</i> spp.	Unused	3.7 ^a	3.3, 4.1	5.3 ^b	4.9, 5.7
	Used	5.2 ^{b,c}	4.8, 5.6	5.8 ^c	5.5, 6.2

^{*} Least square mean estimate

^{a, b, c, d} For a given bacterial group, estimates within a row or column with different superscripts were considered to be statistically different (P -value < 0.05) after adjusting for multiple comparison using the Tukey-Kramer adjustment and for confounding by housing type (freestall vs. tie-stall).

Table 5. Least square means estimated bacterial counts (in log CFU/g) for different production groups of bacteria, in unused recycled manure solids (RMS) according to the method used for production.

Bacterial group	Parameter	Method used to produce RMS				
		S	S-CRD	S-MH	S-MB	AD
Total mesophilic flora	LSM	8.2	6.0 ^a	7.7	8.5 ^b	8.7
	95% CI	6.3, 10.1	4.7, 7.4	7.1, 8.3	7.9, 9.0	6.8, 10.6
Staphylococci	LSM	6.0	4.0	4.8	5.8	5.3
	95% CI	3.7, 8.3	2.3, 5.6	4.1, 5.6	5.2, 6.5	3.0, 7.6
Streptococci	LSM	5.5	4.0	4.3 ^a	5.7 ^b	6.5
	95% CI	3.2, 7.8	2.3, 5.6	3.5, 5.0	5.1, 6.4	4.2, 8.8
<i>E. coli</i>	LSM	4.0	4.0	4.2 ^a	4.9 ^b	4.0
	95% CI	2.8, 5.1	3.1, 4.8	3.8, 4.6	4.6, 5.3	2.8, 5.1
<i>Klebsiella</i> spp.	LSM	3.0	3.0	3.5	4.3	3.0
	95% CI	0.8, 5.1	1.5, 4.5	2.8, 4.1	3.7, 4.9	0.8, 5.1

Least square mean log CFU/g estimate (LSM); separation followed with maturation in a rotative drum (S-CRD), anaerobic digestion (AD), separation followed with maturation in a heap (S-MH), separation with maturation in a box (S-MB) and separation only (S).

^{a, b} For a given bacterial group, estimates within a row with different superscripts were considered to be statistically different ($p\text{-value} < 0.05$) after adjusting for multiple comparison using the Tukey-Kramer adjustment.

Table S1. Salmonella confirmation by the Animal Health Laboratory of the Quebec's Ministry of Agriculture.

Sample	Bedding type	Bedding statue	Serotype
11012100	RMS	Unused	Salmonella K group
11052100	RMS	Unused	Salmonella K group
11272100	RMS	Unused	Salmonella K group
11052200	RMS	Used	Salmonella K group
11182200	RMS	Used	Salmonella C1 group
11222200	RMS	Used	Salmonella B group
11272200	RMS	Used	Salmonella K group
12352100	Straw	Unused	Salmonella K group
12392200	Straw	Used	Salmonella K group

Table S2. PCR primers used in *Listeria monocytogenes* detection in bedding samples.

Gene	Gene role (Identification)	Primer	Primer concentration (μ M)	Primer Sequence (5' - 3')
<i>prfA</i>	<i>L. monocytogenes</i> species	LIP1	0.2	GATACAGAAACATCGGTTGGC
		LIP2	0.2	GTGTAATCTTGATGCCATCAGG
<i>prs</i>	Listeria genus	prsF	0.2	GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG
		prsR	0.2	CAAAGAAACCTTGGATTTGCGG
<i>Lmo</i>	Genosero-group IIc	lmo1118	0.6	AGGGGTCTTAAATCCTGGAA
<i>1118</i>		F		
		lmo1118	0.6	CGGCTTGTTCCGGCATACTTA
		R		
<i>Orf</i>	Genosero-group IIb IVb	orf2819F	0.4	AGCAAAATGCCAAAACTCGT
<i>2819</i>				
		orf2819R	0.4	CATCACTAAAGCCTCCCATTG
<i>Orf</i>	Genesero-group IVb	orf2110F	0.4	AGTGGACAATTGATTGGTGAA
<i>2110</i>		orf2110R	0.4	CATCCATCCCTTACTTTGGAC
<i>Lmo</i>	Genosero-group IIa IIc	lmo0737	0.4	AGGGCTTCAAGGACTTACCC
<i>0737</i>		F		
		lmo0737	0.4	ACGATTTCTGCTTGCCATTC
		R		

Adapted from K  rouanton et al., 2010

Table S3. List of unique genera in unused recycled manure solids bedding (RMS) or in unused straw.

RMS	# OTU	Phylum	Genus
	70	Proteobacteria	Escherichia/Shigella
	169	Actinobacteria	Thermobispora
	244	Proteobacteria	Idiomarina
	301	Proteobacteria	Rheinheimera
	309	Proteobacteria	Schlegelella
	356	Actinobacteria	Thermopolyspora
	363	Proteobacteria	Sandarakinorhabdus
	382	Verrucomicrobia	Verrucomicrobiales_unclassified
	422	Proteobacteria	Alteromonadales_unclassified
	425	Proteobacteria	Chelatococcus
	437	Proteobacteria	Methylobacillus
	444	Firmicutes	Halocella
	551	Chloroflexi	Sphaerobacter
	555	Actinobacteria	Cellulomonas
	607	Actinobacteria	Jonesia
	630	Firmicutes	Ammoniiibacillus
	634	Proteobacteria	Yersinia
	636	Proteobacteria	Neisseriaceae_unclassified
	637	Firmicutes	Tepidimicrobium
	663	Firmicutes	Sinibacillus
	695	Proteobacteria	Ignatzschineria
	708	Firmicutes	Paenisporosarcina
	715	Proteobacteria	Rhodopirellula
	722	Firmicutes	Sphingorhabdus
	727	Planctomycetes	Planctomicrobium
	731	Firmicutes	Clostridium_III
	738	Proteobacteria	Marinobacter
	755	Actinobacteria	Actinotalea

815	Actinobacteria	Piscicoccus
825	Actinobacteria	Nomomuraea
877	Firmicutes	Ornithinibacillus
950	Proteobacteria	Bradymonas
966	Bacteroidetes	Cryomorpha
973	Firmicutes	Megasphaera
977	Actinobacteria	Leifsonia
994	Actinobacteria	Demequina
1004	Proteobacteria	Nannocystaceae_unclassified
1015	Actinobacteria	Gulosibacter
1020	Actinobacteria	Gordonia
1024	Bacteroidetes	Brumimicrobium
1043	Actinobacteria	Thermomonosporaceae_unclassified
1045	Proteobacteria	Nannocystis
1055	Fibrobacteres	Fibrobacteres_unclassified
1082	Firmicutes	Saccharococcus
1095	Proteobacteria	Bordetella
1112	Proteobacteria	Vulgatibacter
1127	Proteobacteria	Moraxellaceae_unclassified
1174	Firmicutes	Peptostreptococcus
1208	Verrucomicrobia	Puniceicoccaceae_unclassified
1229	Firmicutes	Geobacillus
1235	Bacteroidetes	Proteiniphilum
1259	Firmicutes	Sedimentibacter
1266	Chloroflexi	Litorilinea
1281	Actinobacteria	Ornithinicoccus
1311	Bacteroidetes	Flavobacteriales_unclassified
1358	Actinobacteria	Georgenia
1390	Firmicutes	Acidaminococcaceae_unclassified
1397	Actinobacteria	Glycomyces
1401	Proteobacteria	Oceanospirillaceae_unclassified
1427	Proteobacteria	Lysobacter
1432	Actinobacteria	Corynebacteriaceae_unclassified

1435	Proteobacteria	Pseudohongiella
1477	Actinobacteria	Thermomonospora
1538	Proteobacteria	Maricurvus
1541	Firmicutes	Brevibacillus
1561	Firmicutes	Holdmania
1576	Proteobacteria	Steroidobacter
1609	Actinobacteria	Thermasporomyces
1615	Fusobacteria	Fusobacterium
1622	Bacteroidetes	Muricauda
1623	Proteobacteria	Vibrio
1637	Proteobacteria	proteus
1638	Proteobacteria	Ferrovibrio
1682	Firmicutes	Fastidiosipila
1686	Proteobacteria	Thauera
1688	Proteobacteria	Campylobacter
1729	Proteobacteria	Castellaniella
1735	Proteobacteria	Sandaracinus
1754	Proteobacteria	Alteromonadaceae_unclassified
1756	Actinobacteria	Actinomyces
1761	Chloroflexi	Chloroflexales_unclassified
1791	Firmicutes	Trichococcus
1815	Firmicutes	Defluviitalea
1824	Firmicutes	Mobilitalea
1851	Proteobacteria	Alcaligenes
1852	Bacteroidetes	Mariniphaga
1886	Actinobacteria	Cellulosimicrobium
1902	Proteobacteria	Sinobacteraceae_unclassified
1907	SR1	SR1_unclassified
1924	Bacteroidetes	Bergeyella
1963	Firmicutes	Tepidanaerobacter
1971	Firmicutes	Proteiniborus
1972	Proteobacteria	Sorangium
2039	Synergistetes	Synergistaceae_unclassified

2159	Firmicutes	Ercella
2161	Fibrobacteres	Fibrobacter
2173	Bacteroidetes	Dysgonomonas
2194	Proteobacteria	Parvibaculum
2205	Firmicutes	Gallicola
2207	Bacteroidetes	Gelidibacter
2263	Proteobacteria	Herminiimonas
2304	BRC1	BRC1_unclassified
2305	Planctomycetes	Blastopirellula
2310	Proteobacteria	Constrictibacter
2325	Euryarchaeota	Methanosarcina
2403	Firmicutes	Halolactibacillus
2463	Proteobacteria	Kerstersia
2483	Proteobacteria	Chondromyces
2488	Chloroflexi	Oscillochloris
2534	Firmicutes	Lactobacillaceae_unclassified
2547	Actinobacteria	Bifidobacteriaceae_unclassified
2549	Proteobacteria	Oceanibaculum
2557	Firmicutes	Helcococcus
2594	Proteobacteria	Marinobacterium
2608	Euryarchaeota	Methanocorpusculum
2633	Bacteroidetes	Odoribacter
2706	Firmicutes	Saccharofermentans
2727	Firmicutes	Paenivacillaceae_2_unclassified
2751	Euryarchaeota	Methanobacterium
2759	Firmicutes	Thermoactinomycetaceae_1_unclassified
2775	Proteobacteria	Oceanospirillales_inclassified
2802	Actinobacteria	Stackebrandtia
2803	Firmicutes	Parasporobacterium
2825	Firmicutes	Acetoanaerobium
2946	Proteobacteria	Serpens
2958	Proteobacteria	Desulfovibrio
2969	Bacteroidetes	Flammeovirgaceae_unclassified

2983	Actinobacteria	Bogoriellaceae_unclassified
2994	Proteobacteria	Sutterella
2996	Bacteroidetes	Arenibacter
3035	Firmicutes	Guggenheimella
3048	Bacteroidetes	Galbibacter
3067	Bacteroidetes	Rhodothermaceae_unclassified
3090	Firmicutes	Peptoniphilus
3096	Proteobacteria	Burkholderiaceae_unclassified
3118	Proteobacteria	Nitrosomonas
3249	Proteobacteria	Rhodoligotrophos
3262	Proteobacteria	Asticcacaulis
3319	Proteobacteria	Sandaracinobacter
3350	Bacteroidetes	Anaerocella
3471	Firmicutes	Thermaerobacter
3476	Bacteroidetes	Macellibacteroides
3478	Proteobacteria	Halobacteriovorax
3487	Firmicutes	Butyricicoccus
3497	Bacteroidetes	Mariniflexile
3503	Firmicutes	Eubacteriaceae_unclassified
3506	Firmicutes	Caldicoprobacter
3528	Firmicutes	Selenomonas
3597	Proteobacteria	Desulfovibrionaceae_unclassified
3608	Bacteroidetes	Vitellibacter
3676	Proteobacteria	Morganella
3778	Proteobacteria	Maricella_unclassified
3800	Proteobacteria	Zobellella
3821	Proteobacteria	GammaProteobacteria_incertae_sedis_unclassified
3905	Firmicutes	Alkalibaculum
3918	Firmicutes	Sharpea
3938	Proteobacteria	Brucellaceae_unclassified
3951	Synergistetes	Aminivibrio
4095	Proteobacteria	Shewanella
4109	Firmicutes	Proteocatella

4131	Bacteroidetes	Prolixibacteraceae_unclassified
4277	Bacteroidetes	Geofilum
4287	Proteobacteria	Paenochrobactrum
4322	Actinobacteria	Parvibacter
4359	Proteobacteria	Sneathiella
4375	Actinobacteria	Tetrasphaera
4416	Bacteroidetes	Ricknellaceae_unclassified
4421	Bacteroidetes	Winogradskyella
4638	Proteobacteria	Thiopseudomonas
4645	Proteobacteria	Pseudochrobactrum
4721	Firmicutes	Acidaminococcus
4728	Proteobacteria	Candidimonas
4856	Actinobacteria	Thermocrispum
4943	Actinobacteria	Atopobium
5061	Firmicutes	Caldanaerovirga
5069	Firmicutes	Ammoniphilus
5302	Firmicutes	Syntrophococcus
5303	Bacteroidetes	Sporocytophaga
5408	Firmicutes	Succiniclasticum
5438	Firmicutes	Kandleria
5558	Actinobacteria	Denitrobacterium
5571	Firmicutes	Alkaliphilus
5583	Firmicutes	Allisonella
5629	Proteobacteria	Pseudochelatococcus
5651	Firmicutes	Caldalkalibacillus
5705	Verrucomicrobia	Cerasicoccus
5977	Firmicutes	Desulfotomaculum
6012	Proteobacteria	Pelistega
6110	Proteobacteria	Bacteriovoracaceae_unclassified
6122	Firmicutes	Pseudobutyrvibrio
6240	Actinobacteria	Ilumatobacter
6352	Spirochaetes	Spirochaetaceae_unclassified
6474	Actinobacteria	Propionibacteriaceae_unclassified

	6524	Chloroflexi	Thermomicrobia_unclassified
	6683	Verrucomicrobia	opitutae_unclassified
	6836	Actinobacteria	Asaccharobacter
	6876	Firmicutes	Butyrivibrio
	6889	Firmicutes	Schwartzia
	6901	Chloroflexi	Caldilineaceae_unclassified
	7035	Proteobacteria	Chromatiales_unclassified
	7743	Firmicutes	Aeribacillus
	7938	Firmicutes	Anaerosphaera
	7947	Firmicutes	Eubacterium
	7952	Actinobacteria	Iamia
	7961	Firmicutes	Cohnella
	8212	Firmicutes	Anaerofilum
	8281	Euryarchaeota	Methanomassiliicoccus
	8452	Euryarchaeota	Methanoculleus
	8748	Firmicutes	Hespellia
	8858	Firmicutes	Clostridiales_Incertae_Sedis_III_unclassified
	8965	Firmicutes	Peptococcus
	9772	Actinobacteria	Tessaracoccus
	12152	Spirochaetes	Sphaerochaeta
	13187	Firmicutes	Desulfonispora
	28643	Proteobacteria	Xanthomonadales_unclassified
	29926	Proteobacteria	Pseudomonadales_unclassified
	36110	Firmicutes	Tepidibacillus
Straw	65	Proteobacteria	Polaromonas
	168	Actinobacteria	Rathayibacter
	170	Actinobacteria	Kineococcus
	232	Actinobacteria	Curtobacterium
	250	Proteobacteria	Aureimonas
	263	Actinobacteria	Geodermatophilus
	272	Actinobacteria	Saccharopolyspora
	310	Actinobacteria	Clavibacter
	445	Firmicutes	Caryophanon

454	Bacteroidetes	Spirosoma
475	Proteobacteria	Pseudorhodoferax
482	Actinobacteria	Actinopolysporaceae_unclassified
763	Deinococcus-Thermus	Deinococcus
806	Actinobacteria	Quadrisphaera
824	Bacteroidetes	Fibrella
847	Actinobacteria	Williamsia
941	Proteobacteria	Acidovorax
981	Proteobacteria	Aurantimonadaceae_unclassified
1037	Firmicutes	Saccharibacillus
1081	Actinobacteria	Patulibacter
1221	Firmicutes	Planomicrobium
1336	Proteobacteria	Ketogulonicigenium
1474	Proteobacteria	Pseudoalteromonas
1480	Actinobacteria	Prauserella
1500	Actinobacteria	Nakamurella
1553	Actinobacteria	Pseudokineococcus
1613	Firmicutes	Exiguobacterium
1774	Actinobacteria	Marmoricola
1921	Bacteroidetes	Siphonobacter
1995	Actinobacteria	Actinomycetospora
2063	Proteobacteria	Agaricicola
2113	Actinobacteria	Kineosporia
2224	Actinobacteria	Agromyces
2235	Firmicutes	Anaerostipes
2246	Proteobacteria	Caulobacter
2260	Thaumarchaeota	Nitrososphaera_unclassified
2261	Proteobacteria	Acidisoma
2452	Proteobacteria	Rickettsia
2459	Bacteroidetes	Terrimonas
2612	Actinobacteria	Terrabacter
2637	Proteobacteria	Burkholderia
2701	Proteobacteria	Bradyrhizobium

2734	Proteobacteria	Rhizorhabdus
2869	Actinobacteria	Blastococcus
2915	Proteobacteria	Skermanella
3055	Proteobacteria	Aquabacterium
3176	Armatimonadetes	Armatimonadetes_gp1
3384	Proteobacteria	Methylophilus
3446	Proteobacteria	Candidatus_Procabacter
3557	Proteobacteria	Kaistia
3699	Armatimonadetes	Armatimonadetes_unclassified
3881	Proteobacteria	Chiayiivirga
4026	Proteobacteria	Rhodopseudomonas
4097	Acidobacteria	Terriglobus_unclassified
4357	Proteobacteria	Cystobacteraceae_unclassified
4427	Actinobacteria	gaiella
4548	Bacteroidetes	Flavisolibacter
4625	Proteobacteria	Orientia
4773	Actinobacteria	Actinoplanes
4789	Proteobacteria	Reyranela_unclassified
4899	Proteobacteria	Rickettsiaceae_unclassified
4916	Actinobacteria	Phycococcus
4965	Bacteroidetes	Chitinophaga
5206	Proteobacteria	Aminobacter
5248	Bacteroidetes	Ferruginibacter
5345	Actinobacteria	Blastocatella_unclassified
5372	Proteobacteria	Alkanindiges
5461	Actinobacteria	Agrococcus
5535	Bacteroidetes	Rubrivirga
5557	Proteobacteria	Belnapia
5666	Proteobacteria	Alsobacter
5788	Proteobacteria	Noviherbaspirillum
5890	candidate_division_WPS-1	candidate_division_WPS-1_unclassified
6382	Armatimonadetes	Armatimonadetes_gp5_unclassified

6432	Actinobacteria	Dactylosporangium
6522	Actinobacteria	Oryzihumus
6649	Bacteroidetes	Parasegetibacter
6986	Firmicutes	Tumebacillus
7144	Chlamydiae	Parachlamydiaceae_unclassified
7370	Acidobacteria	Gp7_unclassified
7793	Proteobacteria	Labilithrix
8012	Proteobacteria	Myxococcaceae_unclassified
8318	Bacteroidetes	Larkinella
8324	Acidobacteria	Gp3_unclassified
8534	Proteobacteria	Xanthobacteraceae_unclassified
8768	Acidobacteria	Gp4_unclassified
9130	Bacteroidetes	Segetibacter
9415	Actinobacteria	Modestobacter
9421	Proteobacteria	Beijerinckia
10340	Planctomycetes	Singulisphaera
10360	Proteobacteria	Methylobacteriaceae_unclassified
10668	Bacteroidetes	Adhaeribacter
10960	Armatimonadetes	Chthonomonas/Armatimonadetes_gp3
10968	Actinobacteria	Jatrophihabitans
11344	Bacteroidetes	Sediminibacterium
12210	Chloroflexi	Herpetosiphon
13548	Actinobacteria	Kineosporiaceae_unclassified
14239	Proteobacteria	Rubellimicrobium
14634	Planctomycetes	Zavarzinella
15290	Acidobacteria	Gp1_unclassified
16489	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp3_unclassified
19300	Chloroflexi	Ktedonobacter
19735	Planctomycetes	Gemmata

Table S4. List of unique genera in used recycled manure solids bedding (RMS) or in used straw.

RMS	# OTU	Phylum	Genus
	80	Proteobacteria	Salmonella
	169	Actinobacteria	Thermobispora
	194	Proteobacteria	Chelativorans
	197	Firmicutes	Thermobacillus
	236	Cloacimonetes	Candidatus_Cloacamonas_unclassified
	309	Proteobacteria	Schlegelella
	356	Actinobacteria	Thermopolyspora
	363	Proteobacteria	Sandarakinorhabdus
	425	Proteobacteria	Chelatococcus
	437	Proteobacteria	Methylobacillus
	444	Firmicutes	Halocella
	551	Chloroflexi	Sphaerobacter
	591	Firmicutes	Rummeliibacillus
	630	Firmicutes	Ammoniibacillus
	663	Firmicutes	Sinibacillus
	708	Firmicutes	Paenisporosarcina
	755	Actinobacteria	Actinotalea
	825	Actinobacteria	Nonomuraea
	977	Actinobacteria	Leifsonia
	1043	Actinobacteria	Thermomonosporaceae_unclassified
	1045	Proteobacteria	Nannocystis
	1055	Fibrobacteres	Fibrobacteres_unclassified
	1082	Firmicutes	Saccharococcus
	1112	Proteobacteria	Vulgatibacter
	1229	Firmicutes	Geobacillus
	1266	Chloroflexi	Litorilinea
	1541	Firmicutes	Brevibacillus
	1590	Proteobacteria	Methylomicrobium

1622	Bacteroidetes	Muricauda
1638	Proteobacteria	Ferrovibrio
1735	Proteobacteria	Sandaracinus
1761	Chloroflexi	Chloroflexales_unclassified
1815	Firmicutes	Defluviitalea
1824	Firmicutes	Mobilitalea
1852	Bacteroidetes	Mariniphaga
1886	Actinobacteria	Cellulosimicrobium
1902	Proteobacteria	Sinobacteraceae_unclassified
1963	Firmicutes	Tepidanaerobacter
1971	Firmicutes	Proteiniborus
2194	Proteobacteria	Parvibaculum
2263	Proteobacteria	Herminiimonas
2304	BCR1	BRC1_unclassified
2401	Actinobacteria	Aciditerrimonas
2419	Acidobacteria	Acidobacteria_unclassified
2483	Proteobacteria	Chondromyces
2488	Chloroflexi	Oscillochloris
2549	Proteobacteria	Oceanibaculum
2594	Proteobacteria	Marinobacterium
2727	Firmicutes	Paenivacillaceae_2_unclassified
2751	Euryarchaeota	Methanobacterium
2803	Firmicutes	Parasporobacterium
2946	Proteobacteria	Serpens
2969	Bacteroidetes	Flammeovirgaceae_unclassified
3053	Proteobacteria	Thiopfundum
3067	Bacteroidetes	Rhodothermaceae_unclassified
3096	Proteobacteria	Burkholderiaceae_unclassified
3249	Proteobacteria	Rhodoligotrophos
3471	Firmicutes	Thermaerobacter

3506	Firmicutes	Caldicoprobacter
3584	Proteobacteria	Thioalkalspiraceae_unclassified
3594	Proteobacteria	Methylophilaceae_unclassified
3608	Bacteroidetes	Vitellibacter
3800	Proteobacteria	Zobellella
3821	Proteobacteria	Gammaproteobacteria_incertae_sedis_unclassified
3951	Synergistetes	Aminivibrio
4345	Firmicutes	Pelotomaculum
4359	Proteobacteria	Sneathiella
4421	Bacteroidetes	Winogradskyella
4728	Proteobacteria	Candidimonas
4789	Proteobacteria	Reyranella_unclassified
4856	Actinobacteria	Thermocrisum
4915	Bacteroidetes	Chryseolinea_unclassified
5069	Firmicutes	Ammoniphilus
5194	Actinobacteria	Myceligenans
5303	Bacteroidetes	Sporocytophaga
5629	Proteobacteria	Pseudochelatococcus
5651	Firmicutes	Caldalkalibacillus
5871	Actinobacteria	Jiangella
5977	Firmicutes	Desulfotomaculum
6012	Proteobacteria	Pelistega
6047	Actinobacteria	Actinomadura
6683	Verrucomicrobia	Opititae_unclassified
6771	Bacteroidetes	Echinicola
7035	Proteobacteria	Chromatiales_unclassified
7158	Chloroflexi	Ornatilinea
7392	Proteobacteria	Methylobacter
7395	Proteobacteria	Dokdonella
7743	Firmicutes	Aeribacillus

	7849	Proteobacteria	Aquicella
	7952	Actinobacteria	Iamia
	7959	Proteobacteria	Rhodoplanes
	7961	Firmicutes	Cohnella
	8375	Proteobacteria	Solimonas
	8452	Euryarchaeota	Methanoculleus
	8835	Proteobacteria	Bauldia
	8854	Proteobacteria	Methylococcaceae_unclassified
	8975	Proteobacteria	Nitrosospira
	9302	Bacteroidetes	Bizionia
	9887	Proteobacteria	Pseudolabrys
	12615	Planctomycetes	Phycisphaera
	12715	Planctomycetes	Planctomycetes_unclassified
	13398	Proteobacteria	Azospirillum
	13682	Proteobacteria	Haliea
	14256	Proteobacteria	Fontimonas
	14680	Proteobacteria	Simplicispira
	16517	Actinobacteria	Verrucosispora
	18053	Firmicutes	Anaerosporeobacter
	18428	Actinobacteria	Demequinaceae_unclassified
	21631	Proteobacteria	Croceicoccus
	23969	Actinobacteria	Dermabacteraceae_unclassified
	28643	Proteobacteria	Xanthomonadales_unclassified
	30575	Chlamydiae	Chlamydiales_unclassified
	34586	Bacteroidetes	Salinirepens
Straw	36	Proteobacteria	Citrobacter
	144	Proteobacteria	Duganella
	168	Actinobacteria	Rathayibacter
	170	Actinobacteria	Kineococcus
	232	Actinobacteria	Curtobacterium

250	Proteobacteria	Aureimonas
263	Actinobacteria	Geodermatophilus
272	Actinobacteria	Saccharopolyspora
310	Actinobacteria	Clavibacter
445	Firmicutes	Caryophanon
475	Proteobacteria	Pseudorhodoferax
482	Actinobacteria	Actinopolysporaceae_unclassified
616	Proteobacteria	Variovorax
	Deinococcus-	
763	Thermus	Deinococcus
806	Actinobacteria	Quadrisphaera
824	Bacteroidetes	Fibrella
847	Actinobacteria	Williamsia
941	Proteobacteria	Acidovorax
973	Firmicutes	Megasphaera
981	Proteobacteria	Aurantimonadaceae_unclassified
1037	Firmicutes	Saccharibacillus
1336	Proteobacteria	Ketogulonicigenium
1480	Actinobacteria	Prauserella
1505	Proteobacteria	Aeromonas
1553	Actinobacteria	Pseudokineococcus
1613	Firmicutes	Exiguobacterium
1791	Firmicutes	trichococcus
1867	Proteobacteria	Nitrincola
1921	Bacteroidetes	Siphonobacter
1995	Actinobacteria	Actinomycetospora
2000	Firmicutes	Vagococcus
2063	Proteobacteria	Agaricicola
2113	Actinobacteria	Kineosporia
2224	Actinobacteria	Agromyces

2261	Proteobacteria	Acidisoma
2282	Firmicutes	Tetragenococcus
2421	Proteobacteria	Lampropedia
2452	Proteobacteria	Rickettsia
2612	Actinobacteria	Terrabacter
2623	Firmicutes	Dialister
2624	Firmicutes	Leuconostoc
2631	Proteobacteria	Uruburuella
2637	Proteobacteria	Burkholderia
2734	Proteobacteria	Rhizorhabdus
2869	Actinobacteria	Blastococcus
2915	Proteobacteria	Skermanella
2994	Proteobacteria	Sutterella
3055	Proteobacteria	Aquabacterium
3151	Proteobacteria	Aeromonadaceae_unclassified
3176	Armatimonadetes	Armatimonas/Armatimonadetes_gpl
3384	Proteobacteria	Methylophilus
3446	Proteobacteria	Candidatus_Probacter
3476	Bacteroidetes	Macellibacteroides
3699	Armatimonadetes	Armatimonadetes_unclassified
3881	Proteobacteria	Chiayiivirga
3918	Firmicutes	Sharpea
4026	Proteobacteria	Rhodopseudomonas
4088	Bacteroidetes	Arcticibacter
4097	Acidobacteria	Terriglobus_unclassified
4136	Firmicutes	Acetitomaculum
4142	Firmicutes	Faecalibacterium
4294	Firmicutes	Eremococcus
4315	Proteobacteria	Herbaspirillum
4357	Proteobacteria	Cystobacteraceae_unclassified

4377	Firmicutes	Nosocomiicoccus
4427	Actinobacteria	Gaiella
4474	Proteobacteria	Pseudorhodobacter
4529	Bacteroidetes	Cytophaga
4548	Bacteroidetes	Flavisolibacter
4639	Firmicutes	Ezakiella
4649	Actinobacteria	Dermathophilaceae_unclassified
4721	Firmicutes	Acidaminococcus
4737	Proteobacteria	Hyphomonas
4773	Actinobacteria	Actinoplanes
4786	Proteobacteria	Providencia
4899	Proteobacteria	Rickettsiaceae_unclassified
4916	Actinobacteria	Phycococcus
4943	Actinobacteria	Atopobium
5049	Actinobacteria	Herbiconiux
5198	Actinobacteria	Alloscardovia
5206	Proteobacteria	Aminobacter
5345	Acidobacteria	Blastocatella_unclassified
5372	Proteobacteria	Alkanindiges
5557	Proteobacteria	Belnapia
5558	Actinobacteria	Denitrobacterium
5593	Proteobacteria	Azonexus
5702	Elusimicrobia	Elusimicrobium
6287	Firmicutes	Howardella
6382	Armatimonadetes	Armatimonadetes_gp5_unclassified
6469	Proteobacteria	Marinomonas
6480	Actinobacteria	Haloactinobacterium
6528	Bacteroidetes	Barnesiella
6564	Proteobacteria	Moracella
6635	Firmicutes	Anaerofustis

6876	Firmicutes	Butyrivibrio
7086	Euryarchaeota	Methanimicrococcus
7156	Actinobacteria	Geodermatophilaceae_unclassified
7239	Proteobacteria	Pasteurella_unclassified
7370	Acidobacteria	Gp7_unclassified
7397	Proteobacteria	Kingella
7633	Firmicutes	Acetivibrio
7793	Proteobacteria	Labilithrix
7829	Tenericutes	Anaeroplasma
7947	Firmicutes	Eubacterium
8212	Firmicutes	Anaerofilum
8422	Firmicutes	Hydrogenoanaerobacterium
8534	Proteobacteria	Xanthobacteraceae_unclassified
8582	Euryarchaeota	Methanosarcinaceae_unclassified
8739	Bacteroidetes	Mucinivorans
8748	Firmicutes	Hespellia
8768	Acidobacteria	Gp4_unclassified
8965	Firmicutes	Peptococcus
9029	Proteobacteria	Aestuariispira
9130	Bacteroidetes	Segetibacter
9214	Actinobacteria	Slackia
9235	Actinobacteria	Kribella
9415	Actinobacteria	Modestobacter
9563	Lentisphaerae	Oligosphaera
10137	Proteobacteria	Phyllobacterium
10288	Actinobacteria	Rarobacter
10322	Firmicutes	Anaerotruncus
10360	Proteobacteria	Methylobacteriaceae_unclassified
10668	Bacteroidetes	Adhaeribacter
10838	Actinobacteria	Enterorhabdus

10959	Proteobacteria	Halomonadaceae_unclassified
10960	Armatimonadetes	Chthonomonas/Armatimonadetes_gp3
10986	Firmicutes	Clostridiales_Incertae_Sedis_XII_unclassified
10996	Proteobacteria	Neisseria
11511	Proteobacteria	Dechloromonas
11816	Firmicutes	Acetanaerobacterium
11847	Lentisphaerae	Lentisphaerae_unclassified
14634	Planctomycetes	Zavarzinella
14894	Actinobacteria	Nitriliruptor
15081	Firmicutes	Marinilactibacillus
17577	Bacteroidetes	Coprobacter
20105	Actinobacteria	Streptomycetaceae_unclassified

Table S5. List of unique genera in unused or in used straw.

Unused	# OTU	Phylum	Genus
	194	Proteobacteria	Chelativorans
	197	Firmicutes	Thermobacillus
	591	Firmicutes	Rummeliibacillus
	2401	Actinobacteria	Aciditerrimonas
	4625	Proteobacteria	Orientia
	4789	Proteobacteria	Reyranella_unclassified
	4915	Bacteroidetes	Chryseolinea_unclassified
	5535	Bacteroidetes	Rubrivirga
	5666	Proteobacteria	Alsobacter
	5788	Proteobacteria	Noviherbaspirillum
	6432	Actinobacteria	Dactylosporangium
	6522	Actinobacteria	Oryzihumus
	6649	Bacteroidetes	Parasegetibacter
	8012	Proteobacteria	Myxococcaceae_unclassified
	8318	Bacteroidetes	Larkinella
	9421	Proteobacteria	Beijerinckia
	10968	Actinobacteria	Jatrophihabitans
	11344	Bacteroidetes	Sediminibacterium
	12210	Chloroflexi	Herpetosiphon
	13548	Actinobacteria	Kineosporiaceae_unclassified
	14239	Proteobacteria	Rubellimicrobium
	15290	Acidobacteria	Gp1_unclassified
	16489	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp3_unclassified
	19300	Chloroflexi	Ktedonobacter
	19735	Planctomycetes	Gemmata
Used	70	Proteobacteria	Escherichia/Shigella
	244	Proteobacteria	Idiomarina
	301	Proteobacteria	Rheinheimera

382	Verrucomicrobia	Verrucomicrobiales_unclassified
422	Proteobacteria	Alteromonadales_incertae_sedi_unclassified
555	Actinobacteria	Cellulomonas
607	Actinobacteria	Jonesia
616	Proteobacteria	Variovorax
634	Proteobacteria	Yersinia
636	Proteobacteria	Neisseriaceae_unclassified
637	Firmicutes	Tepidimicrobium
641	Proteobacteria	Alishewanella
695	Proteobacteria	Ignatzschineria
715	Planctomycetes	Rhodopirellula
722	Proteobacteria	Sphingorhabdus
727	Planctomycetes	Planctomicrobium
731	Firmicutes	Clostridium_III
738	Proteobacteria	Marinobacter
792	Firmicutes	Chryseomicrobium
815	Actinobacteria	Piscicoccus
877	Firmicutes	Ornithinibacillus
950	Proteobacteria	Bradymonas
966	Bacteroidetes	Cryomorpha
973	Firmicutes	Megasphaera
994	Actinobacteria	Demequina
1004	Proteobacteria	Nannocystaceae_unclassified
1015	Actinobacteria	Gulosibacter
1020	Actinobacteria	Gordonia
1024	Bacteroidetes	Brumimicrobium
1095	Proteobacteria	Bordetella
1127	Proteobacteria	Moraxellaceae_unclassified
1174	Firmicutes	Peptostreptococcus
1208	Verrucomicrobia	Puniceicoccaceae_unclassified

1219	Proteobacteria	Acetobacter
1235	Bacteroidetes	Proteiniphilum
1259	Firmicutes	Sedimentibacter
1281	Actinobacteria	Ornithinococcus
1311	Bacteroidetes	Flavobacteriales_unclassified
1358	Actinobacteria	Georgenia
1390	Firmicutes	Acidaminococcaceae_unclassified
1397	Actinobacteria	Glycomyces
1401	Proteobacteria	oceanospirillaceae_unclassified
1427	Proteobacteria	Lysobacter
1432	Actinobacteria	Corynebacteriaceae_unclassified
1435	Proteobacteria	Pseudohongiella
1505	Proteobacteria	Aeromonas
1538	Proteobacteria	Maricurvus
1561	Firmicutes	Holdemania
1576	Proteobacteria	Steroidobacter
1615	Fusobacteria	Fusobacterium
1623	Proteobacteria	Vibrio
1637	Proteobacteria	Proteus
1682	Firmicutes	Fastidiosipila
1686	Proteobacteria	Thauera
1688	Proteobacteria	Campylobacter
1729	Proteobacteria	Castellaniella
1754	Proteobacteria	Alteromonadaceae_unclassified
1756	Actinobacteria	Actinomyces
1791	Firmicutes	Trichococcus
1851	Proteobacteria	Alcaligenes
1867	Proteobacteria	Nitrincola
1907	SR1	SR1_unclassified
1924	Bacteroidetes	Bergeyella

2000	Firmicutes	Vagococcus
2010	Firmicutes	Macrococcus
2039	Synergistetes	Synergistaceae_unclassified
2159	Firmicutes	Ercella
2161	Fibrobacteres	Fibrobacter
2173	Bacteroidetes	Dysgonomonas
2205	Firmicutes	Gallicola
2207	Bacteroidetes	Gelidibacter
2282	Firmicutes	Tetragenococcus
2305	Planctomycetes	Blastopirellula
2310	Proteobacteria	Constrictibacter
2325	Euryarchaeota	Methanosarcina
2403	Firmicutes	Halolactibacillus
2417	Actinobacteria	Actinomycetaceae_unclassified
2421	Proteobacteria	Lampropedia
2463	Proteobacteria	Kerstesia
2534	Firmicutes	Lactobacillaceae_unclassified
2547	Actinobacteria	Bifidobacteriaceae_unclassified
2557	Firmicutes	Helcococcus
2584	Firmicutes	Peptoniphilaceae_unclassified
2608	Euryarchaeota	Methanocorpusculum
2623	Firmicutes	Dialister
2631	Proteobacteria	Uruburuella
2633	Bacteroidetes	Odoribacter
2706	Firmicutes	Saccharofermentans
2759	Firmicutes	Thermoactinomycetaceae_1_unclassified
2775	Proteobacteria	Oceanospirillales_unclassified
2797	Proteobacteria	Rhodobacter
2802	Actinobacteria	Stackebrandtia
2825	Firmicutes	Acetoanaerobium

2958	Proteobacteria	Desulfovibrio
2983	Actinobacteria	Bogoriellaceae_unclassified
2994	Proteobacteria	Sutterella
2996	Bacteroidetes	Arenibacter
3035	Firmicutes	Guggenheimella
3048	Bacteroidetes	Galbibacter
3081	Proteobacteria	Nitratireductor
3090	Firmicutes	Peptoniphilus
3118	Proteobacteria	Nitrosomonas
3151	Proteobacteria	Aeromonadaceae_unclassified
3241	Proteobacteria	Vitreoscilla
3262	Proteobacteria	Asticcacaulis
3319	Proteobacteria	Sandaracinobacter
3350	Bacteroidetes	Anaerocella
3476	Bacteroidetes	Macellibacteroides
3478	Proteobacteria	Halobacteriovorax
3487	Firmicutes	Butyricicoccus
3497	Bacteroidetes	Mariniflexile
3503	Firmicutes	Eubacteriaceae-Unclassified
3516	Actinobacteria	Arcanobacterium
3528	Firmicutes	Selenomonas
3676	Proteobacteria	Morganella
3905	Firmicutes	Alkalibaculum
3918	Firmicutes	Sharpea
3938	Proteobacteria	Brucellaceae_unclassified
4088	Bacteroidetes	Arcticibacter
4095	Proteobacteria	Shewanella
4109	Firmicutes	Proteocatella
4131	Bacteroidetes	Prolixibacteraceae_unclassified
4136	Firmicutes	Acetitomaculum

4287	Proteobacteria	Paenochrobactrum
4294	Firmicutes	Eremococcus
4315	Proteobacteria	Herbaspirillum
4322	Actinobacteria	Parvibacter
4375	Actinobacteria	Tetrasphaera
4377	Firmicutes	Nosocomiicoccus
4409	Firmicutes	Fusibacter
4416	Bacteroidetes	Rikenellaceae_unclassified
4474	Proteobacteria	Pseudorhodobacter
4489	Proteobacteria	Desulfomicrobium
4529	Bacteroidetes	Cytophaga
4638	Proteobacteria	Thiopseudomonas
4639	Firmicutes	Ezakiella
4645	Proteobacteria	Pseudochrobactrum
4649	Actinobacteria	Dermatophilaceae_unclassified
4721	Firmicutes	Acidaminococcus
4737	Proteobacteria	Hyphomonas
4786	Proteobacteria	Providencia
4943	Actinobacteria	Atopobium
5049	Actinobacteria	Herbiconiux
5198	Actinobacteria	Alloscardovia
5213	Firmicutes	Acetobacterium
5302	Firmicutes	Syntrophococcus
5408	Firmicutes	Succiniclasticum
5438	Firmicutes	Kandleria
5558	Actinobacteria	Denitrobacterium
5571	Firmicutes	Alkaliphilus
5593	Proteobacteria	Azonexus
5702	Elusimicrobia	Elusimicrobium
5705	Verrucomicrobia	Cerasicoccus

5770	Bacteroidetes	Balneola
6006	Proteobacteria	Desulfobulbus
6110	Proteobacteria	Bacteriovoracaceae_unclassified
6122	Firmicutes	Pseudobutyrvibrio
6240	Actinobacteria	ilumatobacter
6287	Firmicutes	Howardella
6373	Firmicutes	Succinispira
6469	Proteobacteria	Marinomonas
6474	Actinobacteria	Propionibacteriaceae_unclassified
6480	Actinobacteria	Haloactinobacterium
6524	Chloroflexi	Thermomicrobia_unclassified
6528	Bacteroidetes	Barnesiella
6564	Proteobacteria	Moraxella
6635	Firmicutes	Anaerofustis
6730	Proteobacteria	Vasilyevaea
6876	Firmicutes	Butyrvibrio
6901	Chloroflexi	Caldilineaceae_unclassified
7086	Euryarchaeota	Methanimicrococcus
7156	Actinobacteria	Geodermatophilaceae_unclassified
7239	Proteobacteria	Pasteurellaceae_unclassified
7397	Proteobacteria	Kingella
7633	Firmicutes	Acetivibrio
7829	Tenericutes	Anaeroplasma
7947	Firmicutes	Eubacterium
8212	Firmicutes	Anaerofilum
8235	Verrucomicrobia	Opitutaceae_unclassified
8281	Euryarchaeota	Methanomassiliicoccus
8422	Firmicutes	Hydrogenoanaerobacterium
8582	Euryarchaeota	Methanosarcinaceae_unclassified
8739	Bacteroidetes	Mucinivorans

8748	Firmicutes	Hespellia
8965	Firmicutes	Peptococcus
9029	Proteobacteria	Aestuariispira
9214	Actinobacteria	Slackia
9235	Actinobacteria	Kribbella
9326	Firmicutes	Alkalibacter
9563	Lentisphaerae	Oligosphaera
9772	Actinobacteria	Tessaracoccus
10137	Proteobacteria	Phyllobacterium
10288	Actinobacteria	Rarobacter
10322	Firmicutes	Anaerotruncus
10716	Planctomycetes	Rubinisphaera
10838	Actinobacteria	Enterorhabdus
10959	Proteobacteria	Halomonadaceae_unclassified
10986	Firmicutes	Clostridiales_Incertae_Sedis_XII_unclassified
10996	Proteobacteria	Neisseria
11078	Parcubacteria	Parcubacteria_unclassified
11511	Proteobacteria	Dechloromonas
11816	Firmicutes	Acetanaerobacterium
11847	Lentisphaerae	Lentisphaerae_unclassified
14894	Actinobacteria	Nitriliruptor
15081	Firmicutes	Marinilactibacillus
16508	Chloroflexi	Nitrolavea
17577	Bacteroidetes	Coprobacter
19616	Actinobacteria	Promicromonosporaceae_unclassified
20105	Actinobacteria	Streptomyetaceae_unclassified

Table S6. List of unique genera in unused or in used RMS.

Unused	# OTU	Phylum	Genus
	36	Proteobacteria	Citrobacter
	144	Proteobacteria	Duganella
	973	Firmicutes	Megasphaera
	1477	Actinobacteria	Thermomonospora
	1609	Actinobacteria	Thermasporomyces
	1791	Firmicutes	Trichococcus
	1972	Proteobacteria	Sorangium
	2624	Firmicutes	Leuconostoc
	2994	Proteobacteria	Sutterella
	3476	Bacteroidetes	Macellibacteroides
	3597	Proteobacteria	Desulfovibrionaceae_unclassified
	3778	Proteobacteria	Marinicella_unclassified
	3918	Firmicutes	Sharpea
	4142	Firmicutes	Faecalibacterium
	4277	Bacteroidetes	Geofilum
	4721	Firmicutes	Acidaminococcus
	4943	Actinobacteria	Atopobium
	5061	Firmicutes	Caldanaerovirga
	5558	Actinobacteria	Denitrobacterium
	5583	Firmicutes	Allisonella
	6352	Spirochaetes	Spirochaetaceae_unclassified
	6836	Actinobacteria	Asaccharobacter
	6876	Firmicutes	Butyrivibrio
	6889	Firmicutes	Schwartzia
	7938	Firmicutes	Anaerosphaera
	7947	Firmicutes	Eubacterium
	8212	Firmicutes	Anaerofilum

	8748	Firmicutes	Hespellia
	8858	Firmicutes	Clostridiales_Incertae_Sedis_III_unclassified
	8965	Firmicutes	Peptococcus
	12152	Spirochaetes	Sphaerochaeta
	13187	Firmicutes	Desulfonispora
	29926	Proteobacteria	Pseudomonadales_unclassified
	36110	Firmicutes	Tepidibacillus
Used	65	Proteobacteria	Polaromonas
	80	Proteobacteria	Salmonella
	236	Cloacimonetes	Candidatus_Cloacamonas_unclassified
	454	Bacteroidetes	Spirosoma
	641	Proteobacteria	Alishewanella
	792	Firmicutes	Chryseomicrobium
	1081	Actinobacteria	Patulibacter
	1219	Proteobacteria	Acetobacter
	1221	Firmicutes	Planomicrobium
	1474	Proteobacteria	Pseudoalteromonas
	1500	Actinobacteria	Nakamurella
	1590	Proteobacteria	Methylomicrobium
	1774	Actinobacteria	Marmoricola
	2010	Firmicutes	Maccrococcus
	2235	Firmicutes	Anaerostipes
	2246	Proteobacteria	Caulobacter
	2260	Thaumarchaeota	Nitrososphaera_unclassified
	2417	Actinobacteria	Actinomycetaceae_unclassified
	2419	Acidobacteria	Acidobacteria_unclassified
	2459	Bacteroidetes	Terrimonas
	2584	Firmicutes	Peptoniphilaceae_unclassified
	2701	Proteobacteria	Bradyrhizobium
	2797	Proteobacteria	Rhodobacter

3053	Proteobacteria	Thiopfundum
3081	Proteobacteria	Nitratreductor
3241	Proteobacteria	Vitreoscilla
3516	Actinobacteria	Arcanobacterium
3557	Proteobacteria	Kaistia
3584	Proteobacteria	Thioalkalspiraceae_unclassified
3594	Proteobacteria	Methylophilaceae_unclassified
4345	Firmicutes	Pelotomaculum
4409	Firmicutes	Fusibacter
4489	Proteobacteria	Desulfomicrobium
4789	Proteobacteria	Reyranella_unclassified
4965	Bacteroidetes	Chitinophaga
5194	Actinobacteria	Myceligenans
5213	Firmicutes	Acetobacterium
5248	Bacteroidetes	Ferruginibacter
5461	Actinobacteria	Agrococcus
5770	Bacteroidetes	Balneola
5871	Actinobacteria	Jiangella
candidate_division_WPS-		
5890	1	candidate_division_WPS-1_unclassified
6006	Proteobacteria	Desulfobulbus
6047	Actinobacteria	Actinomadura
6373	Firmicutes	Succinispira
6730	Proteobacteria	Vasilyevaea
6771	Bacteroidetes	Echinicola
6986	Firmicutes	Tumebacillus
7144	Chlamydiae	Parachlamydiaceae_unclassified
7158	Chloroflexi	Ornatilinea
7392	Proteobacteria	Methylobacter
7395	Proteobacteria	Dokdonella

7849	Proteobacteria	Aquicella
7959	Proteobacteria	Rhodoplanes
8235	Verrucomicrobia	Opitutaceae_unclassified
8324	Acidobacteria	Gp3_unclassified
8375	Proteobacteria	Solimonas
8835	Proteobacteria	Bauldia
8854	Proteobacteria	Methylococcaceae_unclassified
8975	Proteobacteria	Nitrosospira
9302	Bacteroidetes	Bizionia
9326	Firmicutes	Alkalibacter
9887	Proteobacteria	pseudolabrys
10340	Planctomycetes	Singulisphaera
10716	Planctomycetes	Rubinisphaera
11078	Parcubacteria	Parcubacteria_unclassified
12615	Planctomycetes	Phycisphaera
12715	Planctomycetes	Planctomycetes_unclassified
13398	Proteobacteria	Azospirillum
13682	Proteobacteria	Haliea
14256	Proteobacteria	Fontimonas
14680	Proteobacteria	Simplicispira
16508	Chloroflexi	Nitrolancea
16517	Actinobacteria	Verrucosispora
18053	Firmicutes	Anaerosporobacter
18428	Actinobacteria	Demequinaceae_unclassified
19616	Actinobacteria	Promicromonosporaceae_unclassified
21631	Proteobacteria	Croceicoccus
23969	Actinobacteria	dermabacteraceae_unclassified
30575	Chlamydiae	Chlamydiales_unclassified
34586	Bacteroidetes	Salinirepens

Table S7. List of unique genera in separation followed with maturation in a heap (S-MH) or in separation with maturation in a box (S-MB) production.

S-MH	OTU	Phylum	Genus
	114	Proteobacteria	Roseomonas
	1 024	Bacteroidetes	Brumimicrobium
	1 229	Firmicutes	Geobacillus
	1 266	Chloroflexi	Litorilinea
	1 327	Bacteroidetes	Parabacteroides
	1 401	Proteobacteria	Oceanospirillaceae unclassified
	1 605	Bacteroidetes	Cytophagaceae unclassified
	1 634	Verrucomicrobia	Opitutus
	1 729	Proteobacteria	Castellaniella
	1 754	Proteobacteria	Alteromonadaceae unclassified
	1 953	Proteobacteria	Legionella
	2 305	Planctomycetes	Blastopirellula
	2 769	Proteobacteria	Acetobacteraceae unclassified
	3 172	Proteobacteria	Oceanisphaera
	3 249	Proteobacteria	Rhodoligotrophos
S-MB	10	Proteobacteria	Neorhizobium
	845	Actinobacteria	Promicromonospora
	1 068	Chloroflexi	Anaerolineaceae unclassified
	4 473	Firmicutes	Peptostreptococcaceae unclassified

Figures

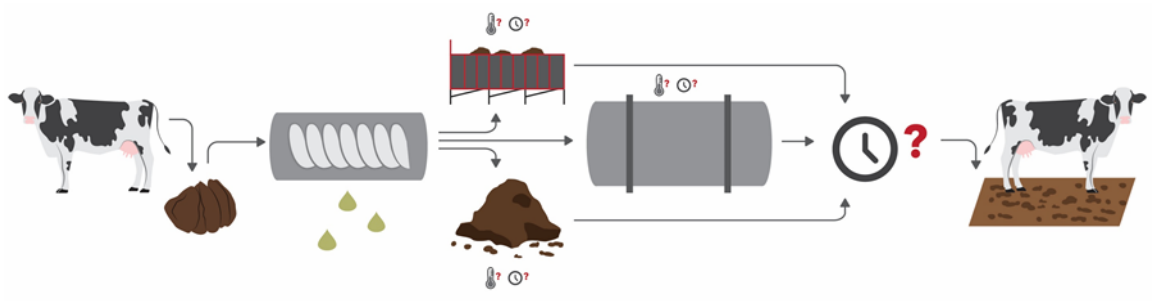


Figure 1. – General RMS production in Eastern Canadian dairy farm. A fraction of the liquid contained in manure is extracted using a screw or, a roller press. The remaining solid fraction can then be used immediately as bedding, but it will often be further processed using various maturation steps. The final product is then used in stalls. (Figure from: Aida Minguez Menendez.)

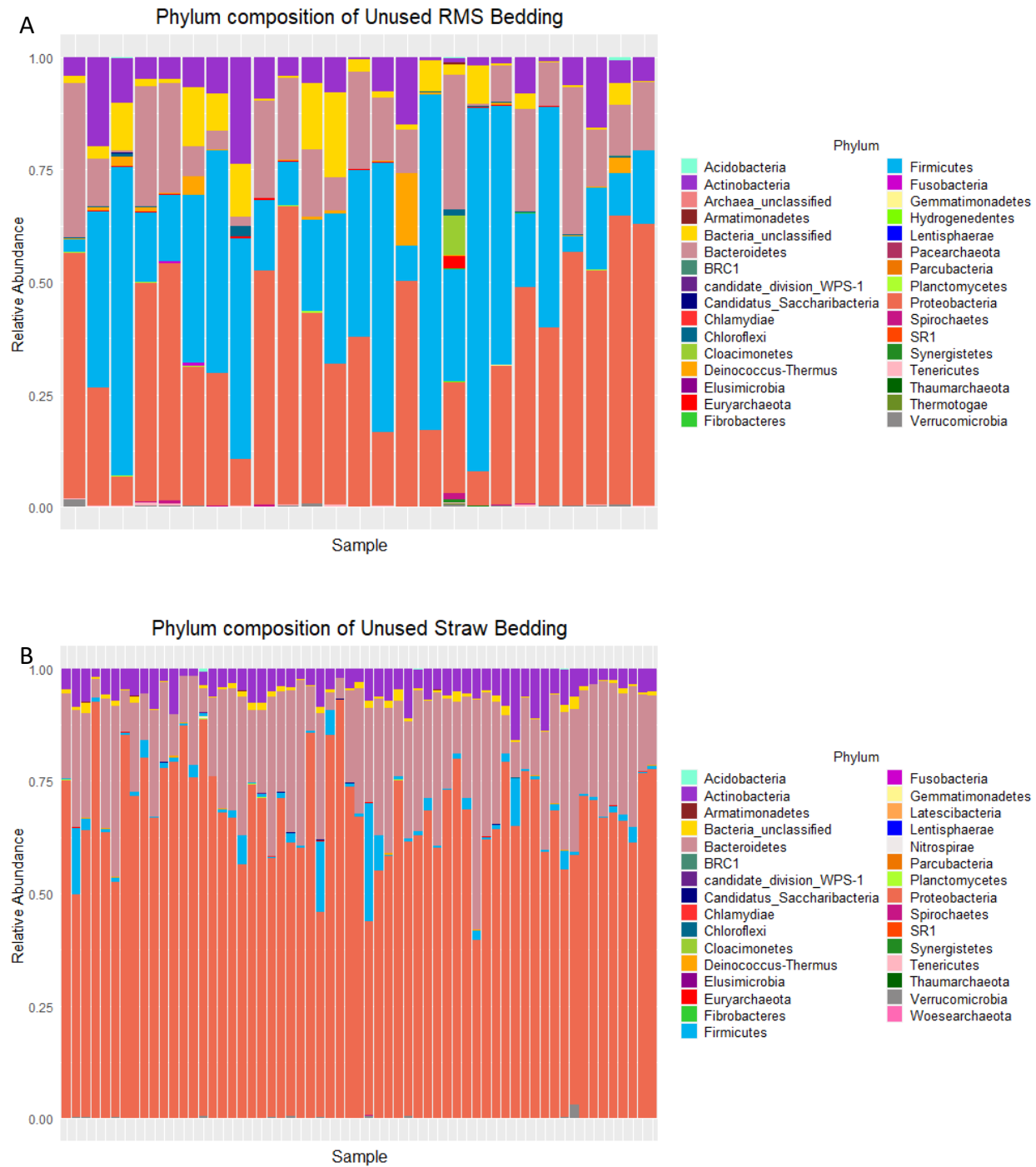


Figure 2. – Phyla repartition in unused Recycled manure solids (A; RMS; n=27) and unused straw (B; n=61) bedding samples. Abundance filter was set to zero and 32 and 31 phyla were obtained for unused RMS and unused straw, respectively.

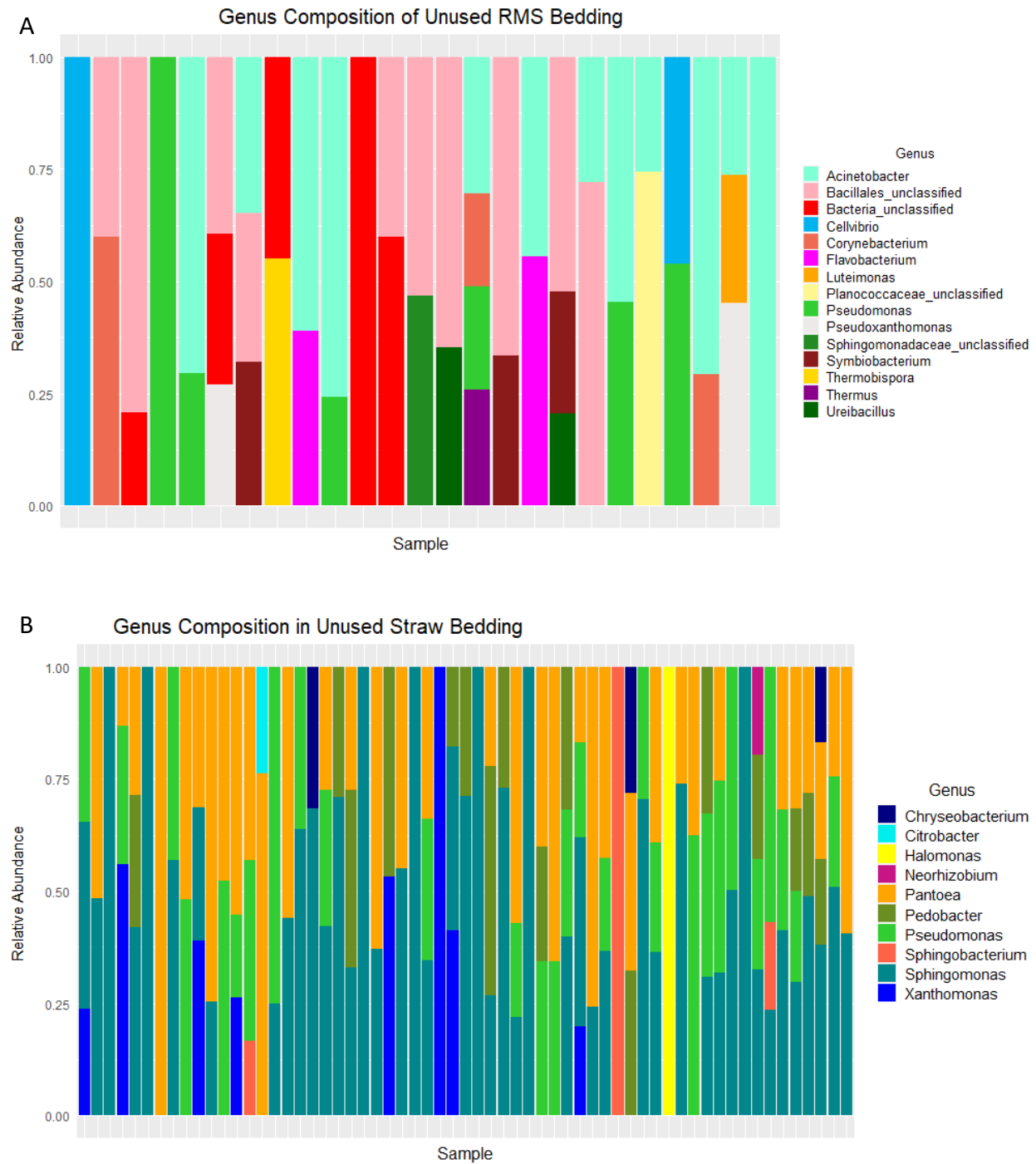


Figure 3. – Genera repartition of unused recycled manure solids (A; RMS; n=27) and unused straw (B; n=61) bedding samples. Abundance filter was set to 0.10 and 15 genera were obtained for unused RMS and 10 genera for unused straw.

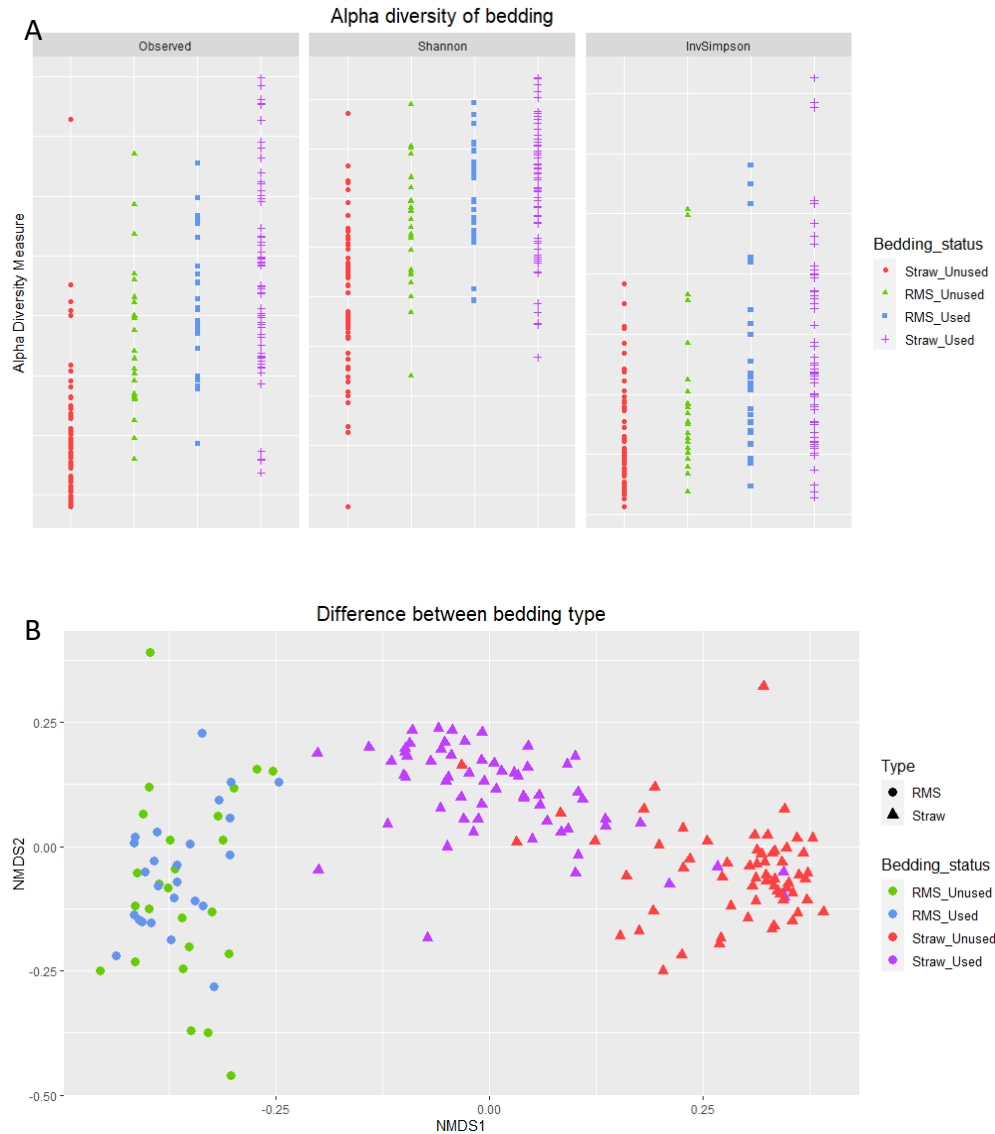


Figure 4. – Microbiota analysis on bedding samples. (A) Observed, Shannon and Inverse Simpson index measures of diversity in used and unused recycled manure solids (RMS) and straw beddings. (B) Non-metric multidimensional scaling plot (NMDS) illustrating microbiota beta diversity according to the bedding type (RMS or straw) and status (used or unused). Each point represents a single bedding sample microbiota based on 107 934 OTUs. Jaccard and Bray-Curtis index were observed and Adonis tests ($p < 0.001$) was performed on Rstudio for statistical analysis.

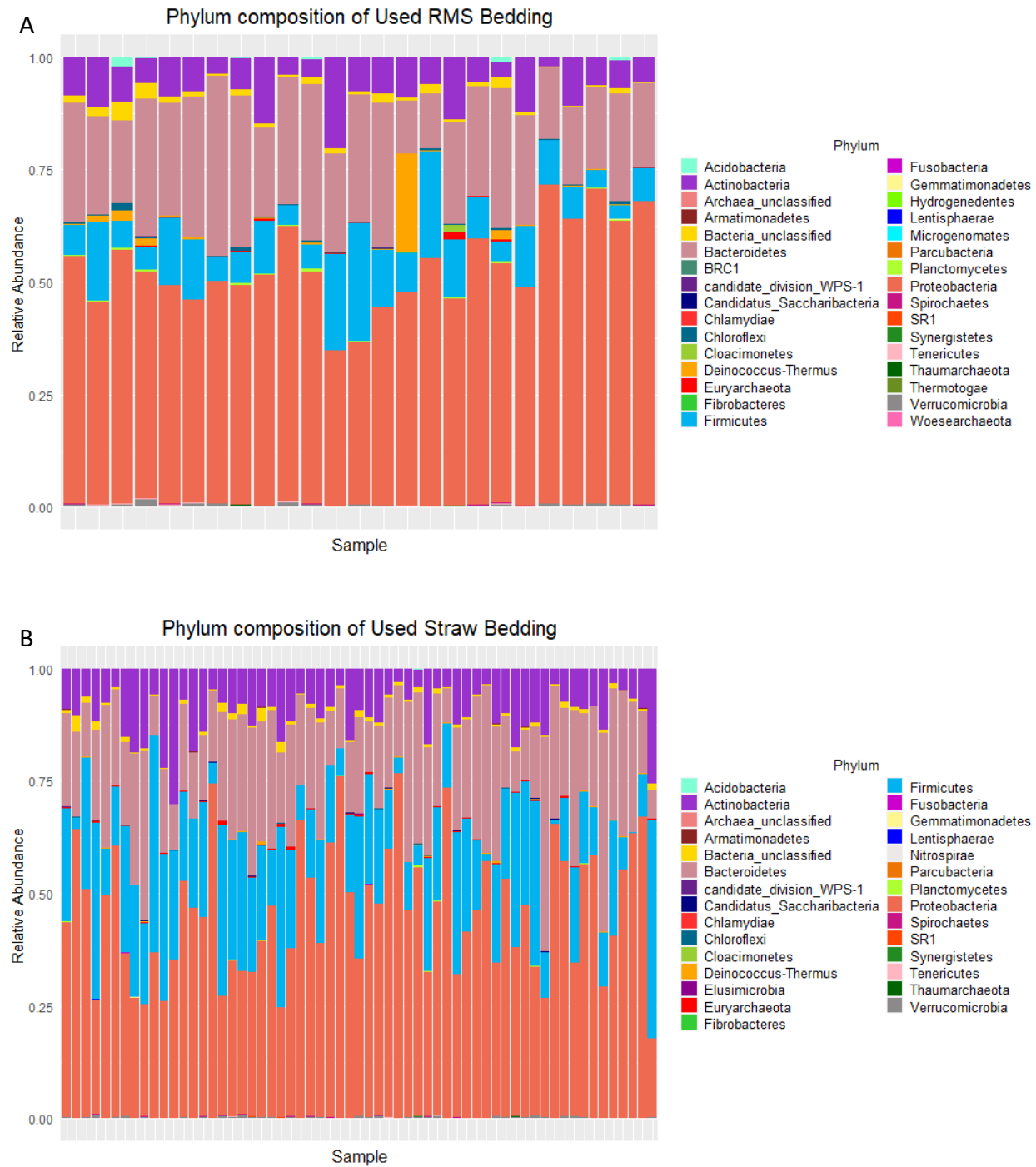


Figure 5. – Phyla repartition in used recycled manure solids (A; RMS; n=27) and used straw (B; n=61) bedding samples. Abundance filter was set to zero and 32 and 29 phyla were obtained for used RMS and used straw beddings, respectively.

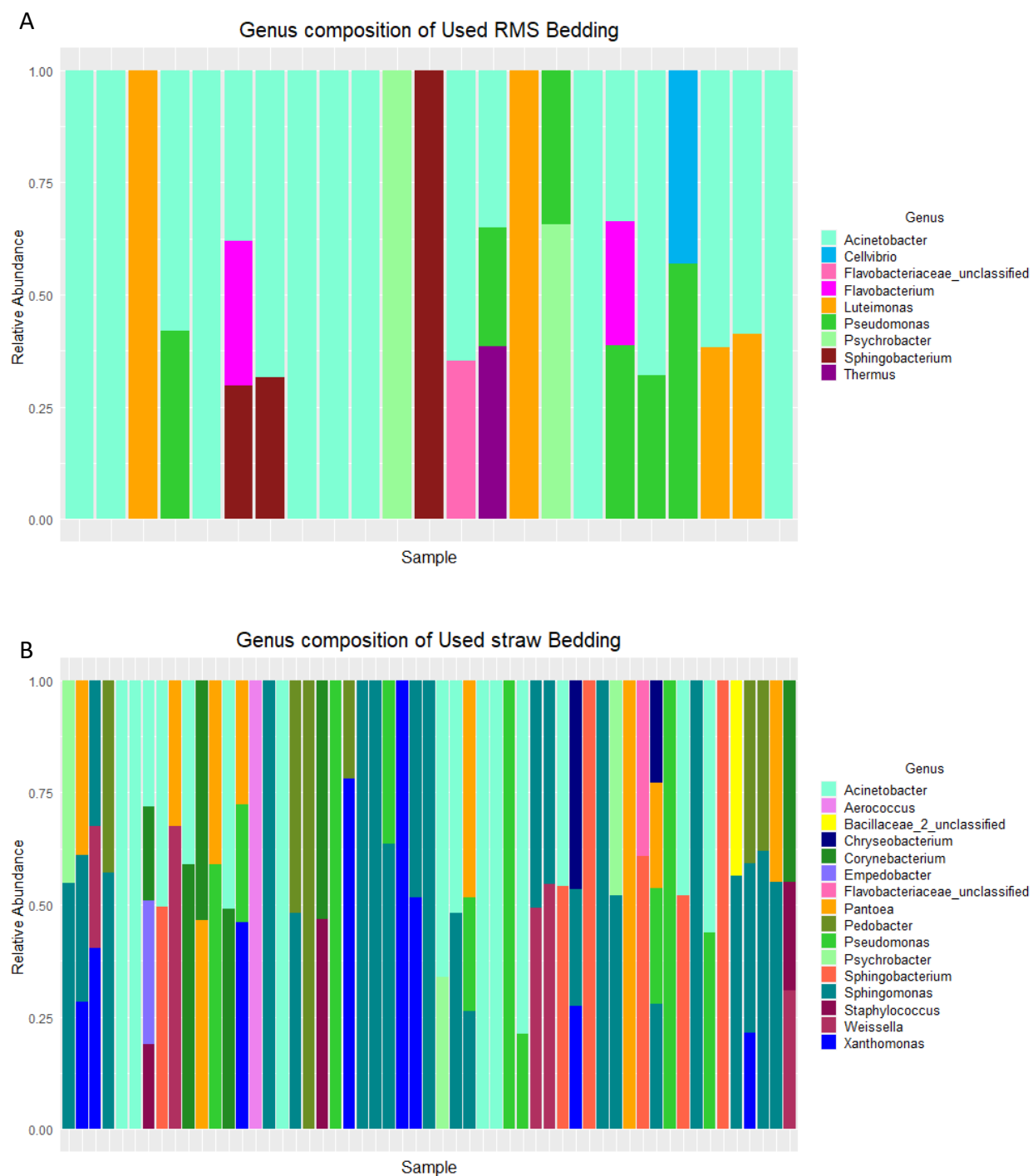


Figure 6. – Genera repartition in used recycled manure solids (A; RMS; n=27) and unused straw (B; n=61) bedding samples. Abundance filter was set to 0.10 and 9 genera were obtained for used RMS and 16 genera for used straw.

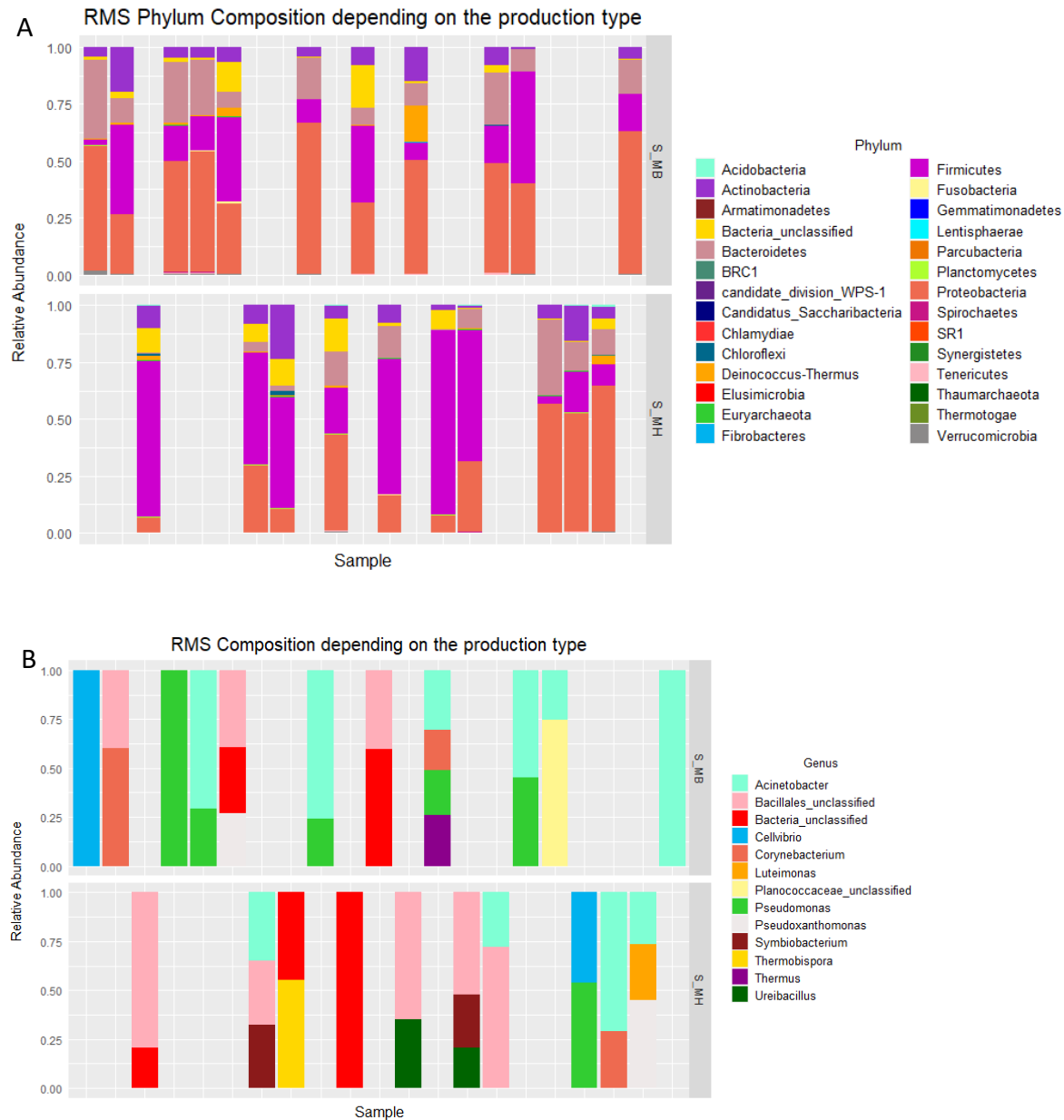


Figure 7. – Phyla repartition in unused recycled manure solids (RMS) production. (A) Phyla retrieved from unused RMS bedding obtained from the two main types of RMS production were compared: separation followed with maturation in a heap (S-MH; n=10) and separation with maturation in a box (S-MB; n=11). Abundance filter was set to zero and 28 phyla were obtained. (B) Genera retrieved drum unused RMS bedding obtained from the two main types of RMS production were compared: separation followed with maturation in a heap (S-MH; n=10) and separation with maturation in a box (S-MB; n=11). The abundance filter was set to 0.10 and 13 genera were obtained.

A

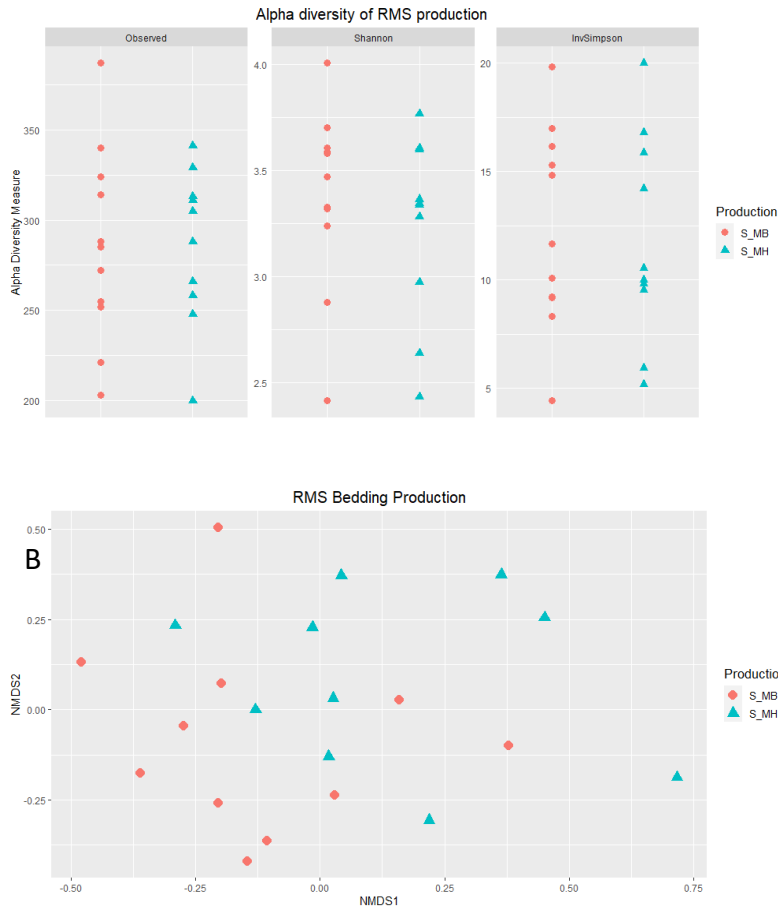


Figure 8. – Microbiota analysis of unused RMS bedding obtained from the two main types of RMS production: separation followed with maturation in a heap (S-MH; $n=10$) and separation with maturation in a box (S-MB; $n=11$). (A) Alpha diversity was measured by Observed, Shannon and InvSimpson index. Statistical comparison was performed using Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$). (B) Non-metric multidimensional scaling plot (NMDS) representing microbiota beta diversity. Each point represents a single unused RMS microbiota associated with one production system and was based on 861 OTUs. Jaccard and Bray-Curtis index were computed and Adonis statistical tests ($p < 0.05$) was performed.

5 Discussion générale

La litière de fumier recyclé est une alternative à la litière conventionnelle de plus en plus utilisée à travers le monde. Elle est produite par plusieurs méthodes, de la simple séparation solide/liquide à une digestion anaérobie, ce qui entraîne des changements dans sa composition physico-chimique (12, 13). Cette litière apporte plusieurs avantages dont le confort, la disponibilité sur la ferme et la réduction des lésions du jarret (11, 14). Toutefois, plusieurs préoccupations demeurent concernant les risques pour la santé animale et humaine. De plus, malgré sa grande popularité, toujours croissante, très peu d'études ont ciblé la composition du microbiote de la LFR et l'impact des différents types de production de celle-ci comparativement à une litière conventionnelle. De plus, la majorité des études portant sur l'utilisation de la LFR ont été réalisées aux États-Unis et très peu ont été réalisées dans l'est du Canada. Ce projet d'étude a permis de décrire la composition microbiologique de la LFR (27 fermes) utilisée au Québec et en Ontario, selon son utilisation et son type de production en comparaison à la litière de paille (61 fermes) à l'aide du séquençage à haut débit et de la microbiologie classique (dénombrement bactérien). De plus, ce projet de recherche a permis d'y étudier la présence de bactéries pathogènes zoonotiques tels que *Listeria monocytogenes* et *Salmonella* spp.

5.1 Interprétations des résultats

Dans le cadre de ce projet de maîtrise, la composition du microbiote de litière de paille et de LFR a été étudiée avant et après leur utilisation. Les résultats de ce projet indiquent que la diversité et la composition microbiologique de la LFR inutilisée sont différentes de la litière de paille inutilisée. En effet, deux groupes distincts et distants l'un de l'autre sont observés dans le graphique NMDS représentant la LFR inutilisée et la litière de paille inutilisée, indiquant une différence claire dans la structure du microbiote. Toutefois, les échantillons qui composent les groupes sont rapprochés indiquant que la structure du microbiote des échantillons se ressemble à l'intérieur d'un même groupe. La différence entre le microbiote de la LFR inutilisée et la litière de paille inutilisée peut être expliquée par l'origine ou encore par des caractéristiques physico-chimiques comme la température, l'humidité, le pH, le taux d'azote et le taux d'oxygène (149, 169-171). Les différentes fermes de l'étude ont été échantillonnées de janvier à juillet, dont la majorité échantillonnée en hiver et quelques-unes au printemps et à l'été. Ainsi, les différentes saisons peuvent avoir un effet sur la composition microbiologique de la litière. Selon la littérature, les

streptocoques et les coliformes ont une plus grande croissance à des températures chaudes et des taux d'humidité élevés durant l'été que des températures plus froides durant l'hiver (17, 33). Or, ce ne sont pas toutes les bactéries qui sont influencées par les saisons. Aucune différence n'a été observée pour la croissance de *Klebsiella* (45). Il a été mentionné dans la littérature que la variable ferme avait un impact sur le microbiote de la litière (160). En effet, les différents types de paille (maïs, lin, soya, etc.) présentent des microbiotes différents les uns des autres. Aussi, il a été mentionné que pour le microbiote de la paille de lin changeait selon les différentes techniques de séparation utilisées (150). Lors de cette étude, une faible différence a été observée entre les différentes fermes de paille au niveau de la diversité microbienne comme l'illustre le NMDS (Figure 4). Cette faible différence pourrait être expliquée par l'utilisation de paille ayant la même longueur (même taille de particule) permettant une croissance bactérienne semblable entre les fermes (17, 33). De plus, la majorité des fermes de pailles a été échantillonnée l'hiver, ainsi la température et le taux d'humidité étaient relativement semblable permettant d'avoir une faible influence sur la croissance bactérienne. Un autre facteur pouvant influencer la diversité microbienne est la taille des particules de litière organique. Une taille de particule plus petite tend à augmenter la population bactérienne de la litière pouvant également augmenter la diversité microbienne (17, 33).

Il a été relevé par ce projet de recherche que les mêmes phylums composaient la LFR avant et après utilisation, mais dans des proportions différentes. Nous nous attendions à retrouver en grande majorité les mêmes phylums puisque la matrice est la même avant et après utilisations, mais nous nous attendions à retrouver des phylums supplémentaires dans la LFR utilisée, qu'on ne retrouverait pas dans la LFR inutilisée, en raison de la contamination par des matières fécales ou l'urine. Le résultat de notre étude est cohérent avec la revue de Godbout et al., la LFR étant constituée de fibres végétales non digérées il est cohérent d'y retrouver des phylums associés aux végétaux, y compris ceux de la paille (10). La litière de fumier recyclé est produite, en grande partie, à partir du fumier de vaches laitières (le fumier étant constitué surtout de fèces, mais aussi de reste de litière, des eaux de lavage, des restes d'aliments non absorbés par l'organisme, etc.). Ainsi, certains phylums retrouvés dans la LFR sont dominants dans les fèces des vaches. Les Firmicutes et les Bacteroidetes sont des phylums dominants dans les fèces comme l'indique l'étude de Hagey et al. (2019) en Californie. Lors de ce projet de maîtrise, ces phylums ont également été retrouvés abondamment dans la LFR. Ainsi, avant même l'utilisation de la LFR, il était possible

de retrouver les principaux phylums dominants dans les fèces confirmant l'importance de l'origine de la matière utilisée comme litière (160).

Le microbiote de la LFR avant utilisation diffère faiblement de celui de la LFR utilisée, autant au niveau de sa structure que de sa diversité. Ainsi, les mêmes phylums sont retrouvés dans la LFR non utilisée et dans la LFR utilisée, mais l'abondance relative de ceux-ci change entre les deux statuts. De plus, les différents phylums contenus dans la LFR avant utilisation possèdent des abondances relatives variables, mais sont plus homogènes dans la LFR utilisée. Cela peut être expliqué par la contamination de la LFR par les fèces des vaches (160, 166). Cette contamination fécale semble apporter une flore microbienne supplémentaire entraînant une homogénéisation des différentes abondances relatives, et ce même avec l'emploi de méthodes de productions de LFR différentes. Le microbiote de la LFR peut être influencé par la température, les niveaux d'oxygène, d'azote et de carbone ou encore par le pH. Ces paramètres peuvent influencer la croissance ou encore la survie des populations bactérienne déjà présente (168-170). Les litières de paille non utilisée et utilisée possèdent un microbiote fortement différent. Ce phénomène peut être expliqué par la contamination de la paille propre par des matières fécales de vaches au cours de l'utilisation. Puisque la paille possède la capacité de promouvoir la croissance bactérienne, une fois contaminée, la densité bactérienne augmente (17, 34, 184). Ainsi, il y a introduction des genres bactériens retrouvés dans la population microbienne des fèces, population importante, ce qui supporte cette transition de microbiote. Dans ce projet de recherche, la LFR est principalement produite à partir d'une séparation de la fraction solide, suivie d'une maturation en amas (n=10) ou en boîte (n=13). Les méthodes de production de la LFR utilisant le compostage en cuve rotative (n=2), la digestion anaérobie (n=1) et la séparation seule (n=1) n'ont pu être introduites dans les analyses de comparaison du microbiote à cause du faible nombre de fermes les utilisant. Ainsi, dans cette étude, le choix de la maturation en boîte ou de la maturation en amas peut influencer la composition et la structure microbienne du microbiote de la LFR. Par contre, la richesse du microbiote n'est pas influencée par le type de production de la LFR. Ce résultat va dans le même sens que d'autres articles qui mentionnent que, quelle que soit la fraction de la LFR considérée (solide ou liquide), les différentes phases du compostage et les différentes méthodes de productions peuvent influencer le microbiote du produit final (160, 166, 170). La méthode utilisant la maturation en amas entraîne une plus faible charge bactérienne que la méthode utilisant la maturation en boîte. L'étude de Fournel et al. (2019) au Québec elle aussi, a obtenu des conclusions similaires. Les auteurs

associaient cette différence aux écarts de température dans le processus de maturation. La température peut être influencée par plusieurs facteurs, dont la grosseur de l'amas de la LFR qui est donc un paramètre à considérer dans la définition des bonnes pratiques de production de la LFR (13). La température peut être variable selon la méthode que l'on emploie dans la production de la LFR. Une méthode de production utilisant la digestion anaérobie s'effectue à 35 °C alors qu'une production utilisant une maturation va nécessiter des températures plus élevées afin de détruire les agents pathogènes (102, 107).

Selon une étude de 2019, *Salmonella* étant fréquemment retrouvée dans les fèces des vaches laitières, la présence de cet agent pathogène dans la LFR inutilisée devait être testée (160). Ainsi, une détection de *Salmonella* (et de *Listeria monocytogenes*) a été effectuée dans le cadre de ce projet de recherche. Ces bactéries pathogènes zoonotiques ont été détectées dans la LFR non utilisée, plus fréquemment que dans la litière de paille non utilisée. La présence de *Salmonella* était confirmée dans 11% des fermes utilisant la LFR, alors que cette bactérie pathogène n'a été mise en évidence dans aucune des fermes utilisant la paille. *Listeria monocytogenes* était présent dans 30% des fermes utilisant la LFR comparativement à 11% dans les fermes utilisant la paille. La plus grande présence de bactéries pathogènes dans la LFR peut être expliquée par l'origine de la litière (fèces) et par une température inadéquate pour la destruction de ces bactéries pathogènes lors de la production (11, 96). De plus, une récente étude de Lasprilla-Mantilla et al. (2019) indique aussi la présence de *Cryptosporidium* spp. dans 85% des fermes utilisant la LFR comparativement à 49% dans les fermes utilisant la litière de paille (112). Aussi, selon les résultats de ce projet de recherche, la LFR non utilisée contient globalement une plus grande charge bactérienne (Streptocoques, Staphylocoques, coliformes et la flore mésophile totale) que la litière de paille non utilisée ce qui est, là encore, en accord avec plusieurs autres études réalisées au cours de ces dernières années dans d'autres régions (11, 113, 114).

Du fait de la matière première à son origine, une méthode optimale de production de LFR devrait éliminer ces agents pathogènes. Afin de détruire les agents pathogènes zoonotiques comme *Listeria monocytogenes* et *Salmonella*, il est recommandé par le Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la lutte contre les changements climatiques d'effectuer un compostage atteignant un minimum de 55 °C ou plus, et ce pendant un minimum de trois jours (99). De plus, il est recommandé d'avoir une période de maturation suffisamment longue afin de

permettre la diminution de l'activité microbienne. Ces recommandations ne sont manifestement pas, ou que partiellement, appliquées. Très peu d'études se sont intéressées à la détection de bactéries pathogènes zoonotiques dans la LFR comparativement aux autres types de litière employés dans l'industrie laitière. Ce faible intérêt pourrait être expliqué par la faible prévalence des mammites causées par *Salmonella* et *Listeria monocytogenes*. Les mammites, même si elles sont causées par d'autres bactéries, restent à l'origine de pertes économiques importantes dans le secteur laitier et sont considérées prioritaires par l'éleveur au détriment de l'intérêt pour des bactéries pathogènes zoonotiques alimentaire (7, 48). Ces bactéries pathogènes (*Salmonella* et *Listeria monocytogenes*) sont fréquemment retrouvées dans les fèces des vaches laitières (74, 75). Ainsi, les avis sont mitigés quant à l'impact de *Salmonella* et *Listeria monocytogenes* dans la LFR sur la santé animale et humaine. Selon les résultats de ce projet de recherche, il serait recommandé de ne pas exposer les jeunes veaux (moins de trois mois) à la LFR puisqu'ils sont plus sensibles et pourraient plus facilement contracter une salmonellose ou une listériose (185, 186). Des études futures d'attribution de source pour des salmonelloses et listérioses humaines seraient nécessaires au Québec, une part importante (environ 11%) du lait et des produits laitiers dans l'apparition de ces pathologies alimentaires chez l'humain étant de mieux en mieux documentée ailleurs dans le monde (187-192).

Comme mentionné précédemment, ces bactéries pathogènes ont été détectées au cours de cette présente étude dans plusieurs fermes laitières de l'est du Canada menant à l'hypothèse que le processus de production actuel de la LFR ne permet pas d'éliminer ces agents pathogènes.

Cependant, il a été identifié dans la littérature que la principale voie de contamination des animaux par ces agents pathogènes zoonotiques est initialement environnementale, et peut conduire dans les troupeaux laitiers l'apparition de salmonelloses ou encore des listérioses (75, 76). De plus, l'environnement contaminé par ces bactéries pathogènes peut mener le personnel de la ferme à contracter une toxi-infection si les mesures de gestions et de protections ne sont pas appliquées adéquatement. Le Code sanitaire pour les animaux terrestres recommande d'appliquer les mesures de gestions adéquates pour les matières fécales et des procédures de contrôle de l'hygiène des employés et de nettoyage et désinfection des équipements à la suite de la manipulation des matières contaminées, comme la litière, afin d'éviter la propagation du pathogène (91).

Selon ce projet de recherche, la méthode de production de la LFR utilisant la maturation en amas apparaît être la moins néfaste comparativement à la maturation en boîte puisqu'elle possède une moins grande charge bactérienne pour tous les types bactériens qui ont été dénombrés et aucune *Salmonella* et peu de *Listeria monocytogenes* ont été détectés dans ces LFR. Toutefois, des recommandations devront être formulées afin de limiter les risques pour la santé humaine et animale pour les différentes méthodes de productions de la LFR. De même, cette étude a permis de constater que les différentes méthodes de productions employées dans les fermes LFR ne sont pas standardisées.

5.2 Limites de l'étude

La principale limite de l'étude est le faible nombre de fermes LFR recrutées et la faible représentation de plusieurs méthodes de production : digesteur anaérobie (n=1), séparation suivie d'un compostage en cuve rotative (n=2) et de la séparation seule (n=1). Le faible nombre de fermes les utilisant limite la possibilité de mettre en évidence les éventuelles différences pour ces différents systèmes. Ainsi, cette étude s'est finalement concentrée principalement sur les méthodes de productions post séparation (maturation en amas (n=10) ou en boîte (n=13)) pour les comparaisons du microbiote. Ainsi, ce projet de recherche n'a pu comparer tous les types de productions de la LFR utilisés actuellement dans les fermes de l'est du Canada. Ainsi, pour une même méthode de production des variantes dans le temps de maturation, l'emploi de compostage, etc. ont été observés et leur influence sur la composition microbiologique de la LFR n'a pas pu être approchée. Les présences de *Listeria monocytogenes* et de *Salmonella* spp. devront être comparées pour des productions standardisées.

Une autre limite de l'étude est l'absence de mesures de microbiote de fèces de vache laitière ayant servi à la production de la LFR non utilisée. Avec ce microbiote, il aurait été possible d'observer à quel point le microbiote des fèces se retrouvait dans la LFR. Cela aurait permis de documenter l'impact du processus de fabrication de la LFR sur la communauté du microbiote des fèces et ainsi apporter des connaissances supplémentaires au projet. Les différents types de litières influencent leur gestion (fréquence d'ajout, retrait, etc.). Ainsi, l'effet de la gestion de la litière et l'effet de la litière doivent être évalués ensemble et ne peuvent être séparés. Ainsi, la variation des fréquences d'ajout de litière dans le temps est une variable intermédiaire de l'étude que nous ne devons pas contrôler entraînant une certaine variabilité dans les résultats de l'étude.

De plus, cette étude a été réalisée à partir d'un plan d'échantillonnage transversal ce qui signifie que chaque ferme n'a été échantillonnée qu'une seule fois. Cela n'a pas permis d'observer si chaque méthode de production de la LFR employée générerait une évolution dans la composition microbiologique de la LFR. En effet, le temps de maturation, la température, le niveau d'oxygène, de carbone et d'azote peuvent être différents et ainsi influencer la croissance des différentes populations bactériennes contenue dans le microbiote du fumier (169-171).

Dans un même ordre d'idée, la méthode de prélèvement ou le nombre de logettes échantillonnées a pu influencer les résultats de l'étude. Le plan d'échantillonnage de l'étude a permis d'échantillonner cinq logettes par ferme et ce une seule fois dans l'étude ce qui diminue la puissance de l'étude. En effet, échantillonner toutes les logettes d'une ferme aurait augmenté la précision de la mesure du niveau de la contamination bactérienne des types de litière. Une quantité différente de litière a été utilisée pour les détections de *Salmonella* et *Listeria monocytogenes* en raison d'un manque d'échantillon. Cette quantité différente a pu influencer les résultats de détection de *Listeria monocytogenes* sous-estimant sa présence dans la litière. Ainsi, augmenter la quantité de litière prélevée pourrait pallier ce manque.

5.3 Aspects novateurs

Ce projet d'étude a permis de décrire la composition et la diversité du microbiote de la LFR comparativement à la composition de la litière de paille dans les fermes de l'est du Canada. Les études précédentes ont ciblé l'impact de la LFR sur le microbiote du lait (168). La majorité de ces études qui ont dénombré des populations bactériennes supérieures dans la LFR que les autres types de litières utilisaient la microbiologie classique (38, 118). Ainsi, cette étude a permis d'augmenter l'état des connaissances disponibles sur la LFR, mettant en lumière la présence de phylums majoritaires chez la LFR qui sont différents de ceux de la litière de paille. De plus, cette étude a permis d'illustrer l'évolution de la composition du microbiote de la LFR avant et après utilisation. Si des différences existent, cette évolution est moindre que celle du microbiote de la litière de paille au cours de l'utilisation.

De plus, cette étude a permis de mettre en lumière un aspect innovateur insoupçonné soit l'étude du microbiote de la litière de paille au niveau de l'est du Canada. Généralement, des dénombrements bactériens ont été réalisés sur la litière de paille afin de la comparer à d'autres types de litières (5, 15). Bien qu'étant la litière la plus utilisée actuellement, très peu d'études ont

porté sur l'analyse de son microbiote. En effet, la litière de paille a été principalement étudiée pour son impact sur le microbiote du sol ou encore sur le microbiote du rumen à titre d'alimentation (146-148).

Un autre aspect novateur porté par ce projet de recherche est l'analyse de différents types de production de la LFR. En effet, la séparation suivie d'une maturation en amas et la séparation suivie de la maturation en boîte ont été comparées permettant d'enrichir les connaissances actuelles et ainsi identifier une différence dans l'efficacité de traitement de la LFR selon les méthodes de productions. Cette comparaison entre ces deux types de productions de la LFR permet d'orienter les producteurs vers un choix plus éclairé. En effet, à l'échelle du Québec, seulement deux autres études ciblent la comparaison des différentes méthodes de productions et ces études n'ont pas effectué une analyse du microbiote (12, 13).

Finalement, ce projet de recherche a permis d'identifier la présence de *Listeria monocytogenes* et *Salmonella* spp. dans la LFR apportant une préoccupation pour la santé humaine et la salubrité du lait. Idéalement la LFR devrait être exempte de ces agents pathogènes zoonotiques. Mais l'impact de cette présence sur la santé humaine est ambigu dans la littérature (11). Quoiqu'il en soit, cette étude permet de mettre en lumière que les présentes méthodes de productions constituent un risque microbiologique plus élevé que la litière de paille et une étude plus approfondie est requise afin d'apporter des recommandations spécifiques aux producteurs pour limiter les risques de retrouver ces bactéries pathogènes zoonotiques dans les produits.

6 Conclusion et perspectives

6.1 Conclusion

Ce projet de recherche a permis de documenter les connaissances du microbiote de la LFR comparativement à la litière de paille. Ainsi, cette étude a pu démontrer que la LFR inutilisée possède une richesse, une distribution et une structure du microbiote différentes de celles de la litière de paille. De plus, cette étude a permis de valider que, pour l'est du Canada aussi, la LFR inutilisée contient une plus grande charge bactérienne que la litière de paille.

De plus, les méthodes de productions de la LFR actuellement utilisées ne garantissent pas la destruction des bactéries pathogènes zoonotiques tels que *Salmonella* spp. et *Listeria monocytogenes*. En effet, la présence de ces bactéries pathogènes a été détectée dans les litières de fumier recyclé non utilisées, pouvant indiquer un processus de contrôle de ces bactéries pathogènes inadéquat. La présence de ces bactéries pathogènes présente un risque pour la santé humaine des travailleurs de la ferme utilisant la LFR et un risque pour la santé animale puisque des salmonelloses, des listérioses ou encore des mammites (chez la vache) peuvent survenir lorsque ces bactéries pathogènes sont présentes.

Les litières produites selon les différentes méthodes de productions possèdent une richesse et une diversité du microbiote semblable, mais les différents types de productions influencent la composition du microbiote de la LFR. De plus, le type de production utilisant la séparation suivie de la maturation en amas semble être la meilleure méthode de production puisqu'elles possèdent une moins grande charge bactérienne.

En conclusion la LFR, actuellement produite dans les fermes de l'Est du Canada, constitue un risque microbiologique plus élevé que la litière de paille.

6.2 Perspectives

La litière de fumier recyclé est produite par diverses méthodes allant de la séparation seule à la digestion anaérobique. Des études futures pourraient cibler un plus grand nombre de fermes utilisant la LFR afin d'augmenter le nombre de fermes par méthode de production de la LFR et augmenter la puissance statistique. Par exemple, cibler les fermes utilisant seulement la séparation, le compostage avec une cuve rotative et les fermes utilisant le digesteur anaérobique permettrait d'identifier les standards de production et de privilégier la méthode de production engendrant le moins de risques pour la santé animale et humaine.

De plus, une étude future pourrait être réalisée afin de voir l'évolution de la contamination microbiologique de la LFR au cours de son utilisation (lorsque mis dans les logettes jusqu'au moment de changer la litière). Cela permettrait de limiter une charge bactérienne trop importante de certaines populations bactériennes pouvant ainsi réduire la possibilité que les vaches contractent des mammites. Dans un même ordre d'idée, les fermes pourraient être échantillonnées à divers moments dans l'année afin de voir l'impact des saisons québécoises et ainsi trouver une méthodologie de production de la LFR qui prenne en considération ce paramètre caractéristique de la province. Aussi, il serait intéressant de faire une étude sur des méthodes de compostage abordables pouvant améliorer la qualité de la LFR en comparaison avec les méthodes employées actuellement.

Finalement, des études ciblant les surfaces des mains des employés, l'équipement ou encore les animaux individuels pourraient être réalisés afin de connaître le niveau de la présence de *Listeria monocytogenes* et de *Salmonella* spp. dans les fermes laitières afin de permettre d'évaluer le risque pour la santé humaine et animale.

7 Références bibliographiques

1. Les Producteurs de lait du Québec. Produit de nos convictions - Rapport annuel 2019. Québec: Les Producteurs de lait du Québec; 2020. Contract No.: ISSN2370-7135.
2. Van Doormaal B, Beavers L. Données à la ferme: défis et possibilités. Canada: Canadian Dairy Network; 2016.
3. Gouvernement du Québec. Production laitière (lait de vache) Québec: Gouvernement du Québec; 2020 [updated November 4 2020. Available from: <https://www.quebec.ca/agriculture-environnement-et-ressources-naturelles/agriculture/industrie-agricole-au-quebec/productions-agricoles/production-de-lait-de-vache/>].
4. Dufour S, Barkema HW, DesCôteaux L, DeVries TJ, Dohoo IR, Reyher K, et al. Development and validation of a bilingual questionnaire for measuring udder health related management practices on dairy farms. Preventive Veterinary Medicine. 2010;95(1):74-85.
5. Robles I, Kelton DF, Barkema HW, Keefe GP, Roy JP, von Keyserlingk MAG, et al. Bacterial concentrations in bedding and their association with dairy cow hygiene and milk quality. animal. 2020;14(5):1052-66.
6. Godden S, Bey R, Lorch K, Farnsworth R, Rapnicki P. Ability of Organic and Inorganic Bedding Materials to Promote Growth of Environmental Bacteria. Journal of Dairy Science. 2008;91(1):151-9.
7. Poirier H. Impact économique de la mammite dans les troupeaux laitiers canadiens Canada2018 [updated 2018; cited 2020 May 05 2020]. Available from: <https://www.thinglink.com/scene/1116370833623744515>.
8. Hogan J, Smith KL. Managing Environmental Mastitis. Veterinary Clinics: Food Animal Practice. 2012;28(2):217-24.
9. Chorfi Y, Couture Y, Fournier A, Dufour S. Comparaison des effets de deux traitements naturels anti-mammites sur la guérison clinique et bactériologique et sur le comptage des cellules

somatiques dans les troupeaux biologiques du Québec. Québec: Faculté de médecine vétérinaire - Université de Montréal; 2013. Contract No.: 09-INNO1-21.

10. Godbout S, Adam S, Belzile L, Brassard P, Chauveau L, Côté C, et al. Litière recyclée en production laitière - État des connaissances et balises Québec: Centre de recherche en sciences animales de Deschambault, Institut de recherche et de développement en agroenvironnement, Université Laval; 2019 [updated 2019; cited 2020 May 05 2020]. Available from: <https://www.agrireseau.net/documents/101036/litiere-recyclee-en-production-laitiere-etat-des-connaissances-et-balises>.

11. Leach KA, Archer SC, Breen JE, Green MJ, Ohnstad IC, Tuer S, et al. Recycling manure as cow bedding: Potential benefits and risks for UK dairy farms. *The Veterinary Journal*. 2015;206(2):123-30.

12. Fournel S, Godbout S, Ruel P, Fortin A, Généreux M, Côté C, et al. Production of recycled manure solids for bedding in Canadian dairy farms: I. Solid-liquid separation. *Journal of Dairy Science*. 2019;102(2):1832-46.

13. Fournel S, Godbout S, Ruel P, Fortin A, Duquette-Lozeau K, Létourneau V, et al. Production of recycled manure solids for use as bedding in Canadian dairy farms: II. Composting methods. *Journal of Dairy Science*. 2019;102(2):1847-65.

14. Green M, Leach KA, Breen J, Ohnstad I, Tuer S, Archer S, et al. Recycled manure solids as bedding for dairy cattle: A scoping study. *Cattle Practice*. 2014;22:207-14.

15. Bradley AJ, Leach KA, Green MJ, Gibbons J, Ohnstad IC, Black DH, et al. The impact of dairy cows' bedding material and its microbial content on the quality and safety of milk – A cross sectional study of UK farms. *International Journal of Food Microbiology*. 2018;269:36-45.

16. Rowbotham RF, Ruegg PL. Bacterial counts on teat skin and in new sand, recycled sand, and recycled manure solids used as bedding in freestalls. *Journal of Dairy Science*. 2016;99(8):6594-608.
17. Cole KJ. Bacterial Counts In Composted And Fresh Recycled Dairy Manure Bedding: The Ohio State University; 2015.
18. Centre canadien d'information laitière. Statistiques laitières et informations sur les marchés Canada: Gouvernement du Canada; 2020 [updated October 26 2020. Available from: <https://www.dairyinfo.gc.ca/fra/statistiques-laitieres-et-informations-sur-les-marches/?id=1502465642636>.
19. Les Producteurs de lait du Québec. Profil et impact de la production laitière Québec: Les Producteurs de lait du Québec,; 2020 [updated 2020. Available from: <https://lait.org/leconomie-du-lait/profil-et-impact-de-la-production-laitiere/>.
20. Bewley JM, Robertson LM, Eckelkamp EA. A 100-Year Review: Lactating dairy cattle housing management. *Journal of Dairy Science*. 2017;100(12):10418-31.
21. National Farm Animal Care Council. Code de pratiques pour le soin et la manipulation des bovins laitiers Canada: Les Producteurs de lait du Québec, National Farm Animal Care Council,; 2009 [updated April 02 2020. 1-69]. Available from: https://www.nfacc.ca/pdfs/codes/bovins_laitiers_code_de_pratiques.pdf.
22. Dairy-Cattle. Minimizing subclinical metabolic diseases United States: Dairexnet; 2019 [updated 2020. Available from: <https://dairy-cattle.extension.org/minimizing-subclinical-metabolic-diseases/>.
23. Gomez A, Cook NB. Time budgets of lactating dairy cattle in commercial freestall herds. *Journal of Dairy Science*. 2010;93(12):5772-81.

24. Munksgaard L, Simonsen HB. Behavioral and pituitary adrenal-axis responses of dairy cows to social isolation and deprivation of lying down. *Journal of Animal Science*. 1996;74(4):769-78.
25. Husfeldt AW, Endres MI. Association between stall surface and some animal welfare measurements in freestall dairy herds using recycled manure solids for bedding. *Journal of Dairy Science*. 2012;95(10):5626-34.
26. Webster J. *Understanding the Dairy Cow*. 3rd ed. Blacwell W, editor. USA: Wiley Blackwell; 2020. 280 p.
27. Baillargeon J, Adam S, Lequin D. *L'étable source de confort - Guide pratique pour l'évaluation et l'amélioration du confort à l'étable* Québec: Valacta; 2014 [updated 2015. Available from: https://www.valacta.com/gpc/_media/Document/guide-confort-etable-final2.pdf.
28. Tucker CB, Weary DM. Bedding on Geotextile Mattresses: How Much is Needed to Improve Cow Comfort? *Journal of Dairy Science*. 2004;87(9):2889-95.
29. Esser NM, Su H, Coblenz WK, Akins MS, Kieke BA, Martin NP, et al. Efficacy of recycled sand or organic solids as bedding sources for lactating cows housed in freestalls. *Journal of Dairy Science*. 2019;102(7):6682-98.
30. Solano L, Barkema HW, Pajor EA, Mason S, LeBlanc SJ, Nash CGR, et al. Associations between lying behavior and lameness in Canadian Holstein-Friesian cows housed in freestall barns. *Journal of Dairy Science*. 2016;99(3):2086-101.
31. Buli TA, Elwes S, Geerets J, Schildmeijer P. Sand: a review of its use in housed dairy cows Pays-Bas2010 [1-74. Available from: https://www.vetvice.com/upload/files/Stallenbouwadvies/100325_Sand_a_review.pdf.

32. Hogan JS, Smith KL, Hoblet KH, Todhunter DA, Schoenberger PS, Hueston WD, et al. Bacterial Counts in Bedding Materials Used on Nine Commercial Dairies¹. *Journal of Dairy Science*. 1989;72(1):250-8.
33. Hogan JS, Smith KL. Risk factors associated with environmental mastitis. *National Mastitis Council Annual Meeting Proceeding*,; 1998.
34. Smith KL, Hogan JS. Bedding Counts in Manure solids. USA: Annual Meeting National Mastitis Council,; 2006.
35. van Gastelen S, Westerlaan B, Houwers DJ, van Eerdenburg FJCM. A study on cow comfort and risk for lameness and mastitis in relation to different types of bedding materials. *Journal of Dairy Science*. 2011;94(10):4878-88.
36. Ministry of Agriculture FaRA. Sand bedding for dairy cows has benefits and cost Ontario: Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs,; 2016 [updated September 25 2020. Available from: http://www.omafra.gov.on.ca/english/livestock/dairy/facts/info_sandbed.htm.
37. Schwarz M, Bonhotal J, Staehr AE. Use of Dried Manure Solids as Bedding For Dairy Cows New York: Cornell Waste Management Institute,; 2010 [cited 2020. 1-9]. Available from: <https://ecommons.cornell.edu/handle/1813/14993>.
38. Husfeldt AW, Endres MI, Salfer JA, Janni KA. Management and characteristics of recycled manure solids used for bedding in Midwest freestall dairy herds. *Journal of Dairy Science*. 2012;95(4):2195-203.
39. House KH. Manutention et entreposage du fumier chargé de sable Ontario: Ministère de l'agriculture, de l'alimentation et des affaires rurales,; 2010 [updated January 01, 2019. Available from: <http://www.omafra.gov.on.ca/french/engineer/facts/10-008.htm>.
40. Ministère de l'agriculture dlaedar. Les avantages et les coûts des litières de sable Ontario: Ministère de l'agriculture, de l'alimentation et des affaires rurales,; 2016 [updated September 25,

2020.

Available

from:

http://www.omafra.gov.on.ca/french/livestock/dairy/facts/info_sandbed.htm.

41. Tuytens F. The importance of straw for pig and cattle welfare: A review. *Applied Animal Behaviour Science*. 2005;92:261-82.
42. Manninen E, de Passillé AM, Rushen J, Narring M, Saloniemi H. Preferences of dairy cows kept in unheated buildings for different kind of cubicle flooring. *Applied Animal Behaviour Science*. 2002;75(4):281-92.
43. Narring M, Manninen E, de Passille AM, Rushen J, Munksgaard L, Saloniemi H. Effects of Sand and Straw Bedding on the Lying Behavior, Cleanliness, and Hoof and Hock Injuries of Dairy Cows. *Journal of dairy science*. 2008;91:570-6.
44. Niraula R, Lebeau B. Alternative bedding materials for livestock Ontario: Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs,; 2018 [updated October 01, 2018. Available from: <http://www.omafra.gov.on.ca/english/environment/facts/18-011.htm>.
45. Harrison E, Bonhotal J, Schwarz M. Using Manure Solids As Bedding. New York: Cornell Waste Management Institute, ; 2008.
46. Samadi S, van Eerdenburg FJCM, Jamshidifard A-R, Otten GP, Droppert M, Heederik DJJ, et al. The influence of bedding materials on bio-aerosol exposure in dairy barns. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*. 2012;22(4):361-8.
47. Natural Resource A, Extension ESC. Dairy Housing and Equipment Systems: Managing and Planning for Profitability : Proceedings from the Dairy Housing and Equipment Systems: Managing and Planning for Profitability Conference, February 1-3, 2000, Camp Hill, Pennsylvania: Natural Resource, Agriculture, and Engineering Service, Cooperative Extension; 2000.

48. Akers RM, Nickerson SC. Mastitis and its Impact on Structure and Function in the Ruminant Mammary Gland. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 2011;16(4):275-89.
49. Bradley AJ. Bovine Mastitis: An Evolving Disease. *The Veterinary Journal*. 2002;164(2):116-28.
50. DesCôteaux L. La mammite clinique: stratégies d'intervention. In: Centre de Référence en Agriculture et Agroalimentaire du Québec, editor. *Symposium sur les bovins laitiers*; Saint-Hyacinthe, Québec. Québec: Centre de Référence en Agriculture et Agroalimentaire du Québec,; 2004. p. 1-23.
51. Blowey R, Edmondson P. *Mastitis Control in Dairy Herds*, 2nd Edition. CABI, editor. UK: CABI,; 2010 04/28. 1-266 p.
52. Hogan JS, Bogacz VL, Thompson LM, Romig S, Schoenberger PS, Weiss WP, et al. Bacterial counts associated with sawdust and recycled manure bedding treated with commercial conditioners. *Journal of dairy science*. 1999;82(8):1690-5.
53. Neave FK, Dodd FH, Kingwill RG. A method of controlling udder disease. *Vet Rec*. 1966;78(15):521-3.
54. Patterson MJ. *Streptococcus*. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston

Copyright © 1996, The University of Texas Medical Branch at Galveston.; 1996.
55. Keefe GP. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. *Can Vet J*. 1997;38(7):429-37.
56. Vincenot F, Saleh M, Prévost G. Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2008;2008(407):61-9.

57. Hodille E. Identifications des facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus* capables d'activer les mastocytes humains cutanes. Lyon: Université Claude Berbard; 2014.
58. Animal Health Diagnostic Center. Staph aureus Herd Infection Control New York: Cornell University, College of Veterinary Medicine;; 2016 [Available from: <https://www.vet.cornell.edu/animal-health-diagnostic-center/testing/protocols/staph-aureus-herd-infection-control>].
59. Monistero V, Graber HU, Pollera C, Cremonesi P, Castiglioni B, Bottini E, et al. *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine Mastitis in Eight Countries: Genotypes, Detection of Genes Encoding Different Toxins and Other Virulence Genes. *Toxins (Basel)*. 2018;10(6):247.
60. Sağlam AG, Şahin M, Çelik E, Çelebi Ö, Akça D, Otlı S. The role of staphylococci in subclinical mastitis of cows and lytic phage isolation against to *Staphylococcus aureus*. *Vet World*. 2017;10(12):1481-5.
61. Vanderhaeghen W, Piepers S, Leroy F, Van Coillie E, Haesebrouck F, De Vliegher S. Identification, typing, ecology and epidemiology of coagulase negative staphylococci associated with ruminants. *The Veterinary Journal*. 2015;203(1):44-51.
62. Nyman AK, Fasth C, Waller KP. Intramammary infections with different non-aureus staphylococci in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2018;101(2):1403-18.
63. Condas LAZ, De Buck J, Nobrega DB, Carson DA, Naushad S, De Vliegher S, et al. Prevalence of non-aureus staphylococci species causing intramammary infections in Canadian dairy herds. *Journal of Dairy Science*. 2017;100(7):5592-612.
64. Traversari J, van den Borne BHP, Dolder C, Thomann A, Perreten V, Bodmer M. Non-aureus Staphylococci Species in the Teat Canal and Milk in Four Commercial Swiss Dairy Herds. *Frontiers in Veterinary Science*. 2019;6(186).

65. Piessens V, Van Coillie E, Verbist B, Supré K, Braem G, Van Nuffel A, et al. Distribution of coagulase-negative *Staphylococcus* species from milk and environment of dairy cows differs between herds. *Journal of Dairy Science*. 2011;94(6):2933-44.
66. Piessens V, De Vliegher S, Verbist B, Braem G, Van Nuffel A, De Vuyst L, et al. Intra-species diversity and epidemiology varies among coagulase-negative *Staphylococcus* species causing bovine intramammary infections. *Veterinary Microbiology*. 2012;155(1):62-71.
67. Gouvernement du Canada. Fiche Technique Santé-Sécurité: Agents Pathogènes - *Klebsiella* spp. Canada: Gouvernement du Canada,; 2019 [updated July 07, 2019. Available from: <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/biosecurite-biosurete-laboratoire/fiches-techniques-sante-securite-agents-pathogenes-evaluation-risques/klebsiella.html>.
68. Symonds JM. *Escherichia coli*: Mechanisms of Virulence. *J R Soc Med*. 1997;90(8):466-.
69. Smith KL, Hogan JS. Environmental Mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 1993;9(3):489-98.
70. Gouvernement du Canada. Fiche Technique Santé-Sécurité: Agents Pathogènes - *Salmonella enterica* spp. Canada: Gouvernement du Canada,; 2010 [updated November 10, 2011. Available from: <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/biosecurite-biosurete-laboratoire/fiches-techniques-sante-securite-agents-pathogenes-evaluation-risques/salmonella-enterica.html>.
71. Holschbach CL, Peek SF. *Salmonella* in Dairy Cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 2018;34(1):133-54.
72. Grimont P, Weill F-X. *Antigenic Formulae of the Salmonella serovars*, (9th ed.) Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institute Pasteur. 2007:1-166.

73. Agriculture PeAQ. Salmonellose Québec: Agriculture, Pêcheries et Alimentation Québec,; 2020 [updated May 29, 2020. Available from: <https://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Productions/santeanimale/maladies/transmissibleshumain/Pages/s/salmonellose.aspx>.
74. Agriculture PeAQ. Salmonella Dublin Québec: Agriculture, Pêcheries et Alimentation Québec,; 2018 [updated August 23, 2018. Available from: <https://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Productions/santeanimale/maladies/soussurveillance/Pages/Salmonella-Dublin.aspx>.
75. Sobur MA, Sabuj AAM, Sarker R, Rahman AMMT, Kabir SML, Rahman MT. Antibiotic-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. associated with dairy cattle and farm environment having public health significance. *Vet World*. 2019;12(7):984-93.
76. United States Department of Agriculture. Dairy 2007 - *Salmonella*, *Listeria*, and *Campylobacter* on U.S. Dairy Operations, 1996-2007. USA: United States Department of Agriculture, Animal and Health Inspection Service, Veterinary Services, National Animal Health Monitoring System,; 2011. Contract No.: 578.0311.
77. Cummings K, Warnick LD, Alexander KA, Cripps CJ, Grohn Y, McDonough P, et al. The incidence of salmonellosis among dairy herds in the northeastern United States. *Journal of dairy science*. 2009;92:3766-74.
78. Cooper J, Walker RD. Listeriosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 1998;14(1):113-25.

79. Winter P, Schilcher F, Bagò Z, Schoder D, Egerbacher M, Baumgartner W, et al. Clinical and histopathological aspects of naturally occurring mastitis caused by *Listeria monocytogenes* in cattle and ewes. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*. 2004;51(4):176-9.
80. Ward TJ, Ducey TF, Usgaard T, Dunn KA, Bielawski JP. Multilocus genotyping assays for single nucleotide polymorphism-based subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(24):7629-42.
81. Seeliger HPR, Höhne K. Chapter II Serotyping of *Listeria monocytogenes* and Related Species. In: Bergan T, Norris JR, editors. *Methods in Microbiology*. 13: Academic Press; 1979. p. 31-49.
82. Roberts A, Nightingale K, Jeffers G, Fortes E, Kongo JM, Wiedmann M. Genetic and phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* lineage III. *Microbiology (Reading)*. 2006;152(Pt 3):685-93.
83. Wiedmann M, Mobini S, Cole JR, Jr., Watson CK, Jeffers GT, Boor KJ. Molecular investigation of a listeriosis outbreak in goats caused by an unusual strain of *Listeria monocytogenes*. *J Am Vet Med Assoc*. 1999;215(3):369-71, 40.
84. Hassan L, Mohammed HO, McDonough PL. Farm-management and milking practices associated with the presence of *Listeria monocytogenes* in New York state dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*. 2001;51(1):63-73.
85. Low JC, Donachie W. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *The Veterinary Journal*. 1997;153(1):9-29.
86. Vilar MJ, Yus E, Sanjuán ML, Diéguez FJ, Rodríguez-Otero JL. Prevalence of and Risk Factors for *Listeria* Species on Dairy Farms. *Journal of Dairy Science*. 2007;90(11):5083-8.

87. Hunt K, Drummond N, Murphy M, Butler F, Buckley J, Jordan K. A case of bovine raw milk contamination with *Listeria monocytogenes*. *Irish Veterinary Journal*. 2012;65(1):13.
88. Nightingale KK, Fortes ED, Ho AJ, Schukken YH, Grohn YT, Wiedmann M. Evaluation of farm management practices as risk factors for clinical listeriosis and fecal shedding of *Listeria monocytogenes* in ruminants. *J Am Vet Med Assoc*. 2005;227(11):1808-14.
89. Gouvernement du Québec. Listériose Québec: Gouvernement du Québec,; 2018 [updated September 13, 2018. Available from: <https://www.quebec.ca/sante/problemes-de-sante/a-z/listeriose/>.
90. Hendriksen SWM, Orsel K, Wagenaar JA, Miko A, van Duijkeren E. Animal-to-human transmission of *Salmonella* Typhimurium DT104A variant. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(12):2225-7.
91. Organisation Mondiale de la Santé Animale. Prévention et Maîtrise des Salmonelles dans les Systèmes de Production Commerciale de Bovins. In: Organisation Mondiale de la Santé Animale, editor. Code sanitaire pour les animaux terrestres. France: Organisation Mondiale de la Santé Animale,; 2019. p. 1-6.
92. Keys JE, Smith LW, Weinland BT. Response of Dairy Cattle Given a Free Choice of Free Stall Location and Three Bedding Materials¹. *Journal of Dairy Science*. 1976;59(6):1157-62.
93. Bramley AJ, Neave FK. Studies on the control of coliform mastitis in dairy cows. *Br Vet J*. 1975;131(2):160-9.
94. Misselbrook TH, Powell JM. Influence of Bedding Material on Ammonia Emissions from Cattle Excreta. *Journal of Dairy Science*. 2005;88(12):4304-12.
95. Lasprilla Mantilla MI. Impact de la litière à base de fumier recyclé sur la propagation des parasites gastro-intestinaux, dans l'environnement des bovins laitiers ainsi que dans le lait. Québec: Université de Montréal; 2019.

96. Carroll EJ, Jasper DE. Distribution of Enterobacteriaceae in Recycled Manure Bedding on California Dairies¹. *Journal of Dairy Science*. 1978;61(10):1498-508.
97. Christensen KV. Solid–Liquid Separation of Animal Slurry. *Animal Manure Recycling* 2013. p. 105-30.
98. Hjorth M, Christensen KV, Christensen ML, Sommer SG. Solid—liquid separation of animal slurry in theory and practice. A review. *Agronomy for Sustainable Development*. 2010;30(1):153-80.
99. Ministère du Développement durable de l'ÉdLlcc. Lignes directrices pour l'encadrement des activités de compostage Québec: Gouvernement du Québec,; 2018 [updated 2018 April 25, 2020]. 91 p. Available from: <http://www.environnement.gouv.qc.ca/matieres/valorisation/lignesdirectrices/compostage.pdf>.
100. Bernal MP, Albuquerque JA, Moral R. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresource Technology*. 2009;100(22):5444-53.
101. Lee SA, Adhikari A, Grinshpun SA, McKay R, Shukla R, Reponen T. Personal exposure to airborne dust and microorganisms in agricultural environments. *J Occup Environ Hyg*. 2006;3(3):118-30.
102. House KH. Using Separated Manure Solids for Compost Bedding Ontario: Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs; 2015 [Available from: <https://files.ontario.ca/omafra-separated-manure-solids-compost-bedding-15-019-en-aoda-2020-04-27.pdf>].
103. Leach KA, Tuer S, Gibbons J, Green M, Bradley AJ. Separated manure solids as bedding for dairy cows - a uk survey. In: The Dairy Group D, The University of Nottingham,, editor. *British Mastitis Conference*; November 12, 2014; Worcester, Worcestershire, UK: The Dairy Group, DairyCo, The University of Nottingham,; 2014. p. 1-99.

104. Spencer R. Dairy Beds With Manure Solids Vermont: BioCycle; 2016 [updated September 15, 2016. Available from: <https://www.biocycle.net/dairy-beds-manure-solids/>.
105. Cornell Waste Management Institute. Using Manure Solids for dairy Barn Bedding New York: Cornell Waste Management Institute,; 2007 [updated 2011. Available from: <http://cwmi.css.cornell.edu/bedding.htm>.
106. Kalamdhad AS, Kazmi AA. Rotary drum composting of different organic waste mixtures. 2009;27(2):129-37.
107. United States Environmental Protection Agency. Basic Information about Anaerobic Digestion (AD) USA: United States Environmental Protection Agency,; 2018 [updated July 27, 2020. Available from: <https://www.epa.gov/anaerobic-digestion/basic-information-about-anaerobic-digestion-ad>.
108. Bishop C, Frear C, Shumway R, Chen S. Economic Evaluation of Commercial dairy Anaerobic Digester. Washington: CSANR, CSANR; 2010.
109. Canadian Biogas Association. Canadian Anaerobic Digestion Guideline. In: Canadian Biogas Association, editor. Canadian Biogas Association,; Canadian Biogas Association,; 2019. p. 1-72.
110. Bishop CP, Shumway CR. The Economics of Dairy Anaerobic Digestion with Coproduct Marketing. 2009;31(3):394-410.
111. Bradley AJ, Leach KA, Archer S, Breen J, Green M, Ohnstad I, et al. Scoping Study on the Potential Risks (and Benefits) of using Recycled Manure Solids as Bedding for Dairy Cattle. UK: DairyCo, The Dairy Group, The University of Nottingham; 2014 April 2014.
112. Lasprilla-Mantilla MI, Wagner V, Pena J, Frechette A, Thivierge K, Dufour S, et al. Effects of recycled manure solids bedding on the spread of gastrointestinal parasites in the environment of dairies and milk. Journal of Dairy Science. 2019;102(12):11308-16.

113. Rowe SM, Godden SM, Royster E, Timmerman J, Crooker BA, Boyle M. Cross-sectional study of the relationships among bedding materials, bedding bacteria counts, and intramammary infection in late-lactation dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2019;102(12):11384-400.
114. Patel K, Godden SM, Royster E, Crooker BA, Timmerman J, Fox L. Relationships among bedding materials, bedding bacteria counts, udder hygiene, milk quality, and udder health in US dairy herds. *Journal of Dairy Science*. 2019;102(11):10213-34.
115. Rowbotham RF, Ruegg PL. Associations of selected bedding types with incidence rates of subclinical and clinical mastitis in primiparous Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2016;99(6):4707-17.
116. Feiken M, Van Laarhoven W. Verslag van een praktijkonderzoek naar het gebruik van vaste fractie uit gescheiden mest als boxbeddingsmateriaal in ligboxen voor melkvee. English version 2014 : Recycled manure solids (RMS) as biobedding in cubicles for dairy cattle. Considerations and tips for practice. UK: Valacon Dairy; 2012.
117. Sorter DE, Kester HJ, Hogan JS. Short communication: Bacterial counts in recycled manure solids bedding replaced daily or deep packed in freestalls. *Journal of Dairy Science*. 2014;97(5):2965-8.
118. Cole KJ, Hogan JS. *Short communication:* Environmental mastitis pathogen counts in freestalls bedded with composted and fresh recycled manure solids. *Journal of Dairy Science*. 2016;99(2):1501-5.
119. Habing G, Lombard JE, Koprak CA, Dargatz D, Kaneene J. Farm-Level Associations with the Shedding of Salmonella and Antimicrobial-Resistant Salmonella in U.S. Dairy Cattle. 2012;9(9):815-21.

120. Rowbotham RF, Ruegg PL. Association of bedding types with management practices and indicators of milk quality on larger Wisconsin dairy farms. *Journal of Dairy Science*. 2015;98(11):7865-85.
121. Hofmann N. Profil géographique de la production de fumier de bétail au Canada, 2006 Canada: Statistique Canada,; 2006 [updated November 27, 2015. Available from: <https://www150.statcan.gc.ca/n1/pub/16-002-x/2008004/article/10751-fra.htm>.
122. Lombard JE, Tucker CB, von Keyserlingk MAG, Koprak CA, Weary DM. Associations between cow hygiene, hock injuries, and free stall usage on US dairy farms. *Journal of Dairy Science*. 2010;93(10):4668-76.
123. Morgan XC, Segata N, Huttenhower C. Biodiversity and functional genomics in the human microbiome. *Trends Genet*. 2013;29(1):51-8.
124. Calenge F, Martin C, Floch N, Phocas F, Morgavi D, Rogel-Gaillard C, et al. Intégrer la caractérisation du microbiote digestif dans le phénotypage de l'animal de rente : vers un nouvel outil de maîtrise de la santé en élevage ? *Productions Animales -Paris- Institut National de la Recherche Agronomique-*. 2014;27:209-22.
125. Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota — masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*. 2013;11(4):227-38.
126. Schutz S. Introduction à la métagénomique: dridk.me; 2016 [Available from: <https://dridk.me/metagenomique.html>.
127. Nguyen N-P, Warnow T, Pop M, White B. A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity. *npj Biofilms and Microbiomes*. 2016;2(1):16004.
128. Tringe SG, Hugenholtz P. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Current Opinion in Microbiology*. 2008;11(5):442-6.

129. de la Cuesta-Zuluaga J, Escobar JS. Considerations For Optimizing Microbiome Analysis Using a Marker Gene. *Front Nutr*. 2016;3:26-.
130. Srinivasan R, Karaoz U, Volegova M, MacKichan J, Kato-Maeda M, Miller S, et al. Use of 16S rRNA Gene for Identification of a Broad Range of Clinically Relevant Bacterial Pathogens. *PLOS ONE*. 2015;10(2):e0117617.
131. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*. 2010;7(5):335-6.
132. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(23):7537-41.
133. Edgar R, Haas B, Clemente J, Quince C, Knight R. UCHIIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2011;27:2194-200.
134. Clooney AG, Fouhy F, Sleator RD, O' Driscoll A, Stanton C, Cotter PD, et al. Comparing Apples and Oranges?: Next Generation Sequencing and Its Impact on Microbiome Analysis. *PLOS ONE*. 2016;11(2):e0148028.
135. Sul WJ, Cole JR, Jesus EdC, Wang Q, Farris RJ, Fish JA, et al. Bacterial community comparisons by taxonomy-supervised analysis independent of sequence alignment and clustering. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(35):14637-42.
136. Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, et al. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(Database issue):D633-D42.
137. Willis AD. Rarefaction, Alpha Diversity, and Statistics. *Frontiers in Microbiology*. 2019;10(2407).

138. Lande R. Statistics and Partitioning of Species Diversity, and Similarity among Multiple Communities. *Oikos*. 1996;76(1):5-13.
139. Purschke O, Schmid BC, Sykes MT, Poschlod P, Michalski SG, Durka W, et al. Contrasting changes in taxonomic, phylogenetic and functional diversity during a long-term succession: insights into assembly processes. *Journal of Ecology*. 2013;101(4):857-66.
140. Legendre P, De Cáceres M. Beta diversity as the variance of community data: dissimilarity coefficients and partitioning. *Ecology Letters*. 2013;16(8):951-63.
141. Mainali KP, Bewick S, Thielen P, Mehoke T, Breitwieser FP, Paudel S, et al. Statistical analysis of co-occurrence patterns in microbial presence-absence datasets. *PLOS ONE*. 2017;12(11):e0187132.
142. Schroeder PJ, Jenkins DG. How robust are popular beta diversity indices to sampling error? *Ecosphere*. 2018;9(2):e02100.
143. Holland S. Non-Metric Multidimensional Scaling (NMS) Athens: University of Georgia,; 2008 [updated December 2019. Available from: <http://strata.uga.edu/8370/handouts/nmsTutorial.pdf>.
144. Xu J. Next-generation Sequencing - Current Technologies and Applications. Press CA, editor. Ontario: Caister Academic Press; 2014. 160 p.
145. Stewart CJ, Ajami NJ, O'Brien JL, Hutchinson DS, Smith DP, Wong MC, et al. Temporal development of the gut microbiome in early childhood from the TEDDY study. *Nature*. 2018;562(7728):583-8.
146. Yang H, Ma J, Rong Z, Zeng D, Wang Y, Hu S, et al. Wheat Straw Return Influences Nitrogen-Cycling and Pathogen Associated Soil Microbiota in a Wheat–Soybean Rotation System. *Frontiers in Microbiology*. 2019;10(1811).

147. Liu J, Zhang M, Xue C, Zhu W, Mao S. Characterization and comparison of the temporal dynamics of ruminal bacterial microbiota colonizing rice straw and alfalfa hay within ruminants. *Journal of Dairy Science*. 2016;99(12):9668-81.
148. Mu CT, Ding N, Hao XY, Zhao YB, Wang PJ, Zhao JX, et al. Effects of different proportion of buckwheat straw and corn straw on performance, rumen fermentation and rumen microbiota composition of fattening lambs. *Small Ruminant Research*. 2019;181:21-8.
149. Tang MT, Han H, Yu Z, Tsuruta T, Nishino N. Variability, stability, and resilience of fecal microbiota in dairy cows fed whole crop corn silage. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2017;101(16):6355-64.
150. Djemiel C, Grec S, Hawkins S. Characterization of Bacterial and Fungal Community Dynamics by High-Throughput Sequencing (HTS) Metabarcoding during Flax Dew-Retting. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:2052-.
151. Czerkawski JW. An Introduction to Rumen Studies. Press P, editor. New York: Pergamon Press; 1986. 236 p.
152. Chenost M, l'agriculture OdNUplae, Kayouli C, Food, Nations AOotU. Utilisation des fourrages grossiers en régions chaudes: Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture; 1997.
153. Krehbiel CR. INVITED REVIEW: Applied nutrition of ruminants: Fermentation and digestive physiology¹. *The Professional Animal Scientist*. 2014;30(2):129-39.
154. Matthews C, Crispie F, Lewis E, Reid M, O'Toole PW, Cotter PD. The rumen microbiome: a crucial consideration when optimising milk and meat production and nitrogen utilisation efficiency. *Gut Microbes*. 2019;10(2):115-32.

155. Dowd SE, Callaway TR, Wolcott RD, Sun Y, McKeehan T, Hagevoort RG, et al. Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiology*. 2008;8(1):125.
156. Bickhart DM, Weimer PJ. Symposium review: Host–rumen microbe interactions may be leveraged to improve the productivity of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2018;101(8):7680-9.
157. Jami E, Mizrahi I. Composition and Similarity of Bovine Rumen Microbiota across Individual Animals. *PLOS ONE*. 2012;7(3):e33306.
158. Bach A, López-García A, González-Recio O, Elcoso G, Fàbregas F, Chaucheyras-Durand F, et al. Changes in the rumen and colon microbiota and effects of live yeast dietary supplementation during the transition from the dry period to lactation of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2019;102(7):6180-98.
159. Mao S, Zhang M, Liu J, Zhu W. Characterising the bacterial microbiota across the gastrointestinal tracts of dairy cattle: membership and potential function. *Scientific Reports*. 2015;5(1):16116.
160. Hagey JV, Bhatnagar S, Heguy JM, Karle BM, Price PL, Meyer D, et al. Fecal Microbial Communities in a Large Representative Cohort of California Dairy Cows. *Frontiers in Microbiology*. 2019;10(1093).
161. Klein-Jöbstl D, Quijada NM, Dzieciol M, Feldbacher B, Wagner M, Drillich M, et al. Microbiota of newborn calves and their mothers reveals possible transfer routes for newborn calves' gastrointestinal microbiota. *PLOS ONE*. 2019;14(8):e0220554.
162. Gomez DE, Arroyo LG, Costa MC, Viel L, Weese JS. Characterization of the Fecal Bacterial Microbiota of Healthy and Diarrheic Dairy Calves. *J Vet Intern Med*. 2017;31(3):928-39.

163. Rice WC, Galyean ML, Cox SB, Dowd SE, Cole NA. Influence of wet distillers grains diets on beef cattle fecal bacterial community structure. *BMC Microbiology*. 2012;12(1):25.
164. Alipour MJ, Jalanka J, Pessa-Morikawa T, Kokkonen T, Satokari R, Hynönen U, et al. The composition of the perinatal intestinal microbiota in cattle. *Scientific Reports*. 2018;8(1):10437.
165. Yeoman CJ, Ishaq SL, Bichi E, Olivo SK, Lowe J, Aldridge BM. Biogeographical Differences in the Influence of Maternal Microbial Sources on the Early Successional Development of the Bovine Neonatal Gastrointestinal tract. *Scientific Reports*. 2018;8(1):3197.
166. Zhong X, Li X, Zeng Y, Wang S, Sun Z-Y, Tang Y-Q. Dynamic change of bacterial community during dairy manure composting process revealed by high-throughput sequencing and advanced bioinformatics tools. *Bioresource Technology*. 2020;306:123091.
167. Guron GKP, Arango-Argoty G, Zhang L, Pruden A, Ponder MA. Effects of Dairy Manure-Based Amendments and Soil Texture on Lettuce- and Radish-Associated Microbiota and Resistomes. *mSphere*. 2019;4(3):e00239-19.
168. Gagnon M, Hamelin L, Fréchette A, Dufour S, Roy D. Effect of recycled manure solids as bedding on bulk tank milk and implications for cheese microbiological quality. *Journal of Dairy Science*. 2020;103(1):128-40.
169. Hanajima D, Fukumoto Y, Yasuda T, Suzuki K, Maeda K, Morioka R. Bacterial community dynamics in aerated cow manure slurry at different aeration intensities. *Journal of Applied Microbiology*. 2011;111(6):1416-25.
170. Pandey P, Chiu C, Miao M, Wang Y, Settles M, del Rio NS, et al. 16S rRNA analysis of diversity of manure microbial community in dairy farm environment. *PLOS ONE*. 2018;13(1):e0190126.

171. Meng Q, Yang W, Men M, Bello A, Xu X, Xu B, et al. Microbial Community Succession and Response to Environmental Variables During Cow Manure and Corn Straw Composting. *Frontiers in Microbiology*. 2019;10(529).
172. Derakhshani H, Fehr KB, Sepehri S, Francoz D, De Buck J, Barkema HW, et al. Invited review: Microbiota of the bovine udder: Contributing factors and potential implications for udder health and mastitis susceptibility. *Journal of Dairy Science*. 2018;101(12):10605-25.
173. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal*. 2012;6(8):1621-4.
174. Thibodeau A, Letellier A, Yergeau É, Larrivière-Gauthier G, Fravallo P. Lack of Evidence That Selenium-Yeast Improves Chicken Health and Modulates the Caecal Microbiota in the Context of Colonization by *Campylobacter jejuni*. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8(451).
175. Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79(17):5112-20.
176. Larivière-Gauthier G, Thibodeau A, Letellier A, Yergeau E, Fravallo P. Reduction of Salmonella Shedding by Sows during Gestation in Relation to Its Fecal Microbiome. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8.
177. Lebel P, Letellier A, Longpré J, Laplante B, Yergeau E, Fravallo P. Feed presentation options in Swine early fattening mitigates Salmonella shedding and specifically modulates the faecal microbiota. *Journal of Applied Microbiology*. 2017;122(1):30-9.
178. BIO RAD. RAPID'L.mono/Agar. In: BIO RAD, editor.: BIO RAD;; 2014. p. 1-7.

179. K  rouanton A, Marault M, Petit L, Grout J, Dao TT, Brisabo  s A. Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping. *Journal of Microbiological Methods*. 2010;80(2):134-7.
180. Chen Z, Zhang W, Yang L, Stedtfeld RD, Peng A, Gu C, et al. Antibiotic resistance genes and bacterial communities in cornfield and pasture soils receiving swine and dairy manures. *Environmental Pollution*. 2019;248:947-57.
181. Jin W, Wang Y, Li Y, Cheng Y, Zhu W. Temporal changes of the bacterial community colonizing wheat straw in the cow rumen. *Anaerobe*. 2018;50:1-8.
182. Okamoto E, Miyanishi H, Nakamura A, Kobayashi T, Kobayashi N, Terawaki Y, et al. Bacteriological evaluation of composted manure solids prepared from anaerobic digested slurry for hygienic recycled bedding materials for dairy cows. *Animal Science Journal*. 2018;89(4):727-32.
183. Misra RV, Roy RN, Hiraoka H. Méthode de compostage au niveau de l'exploitation agricole Rome: Food and Agriculture Organisation (FAO); 2005 [July 19, 2020]. Available from: <http://www.fao.org/3/y5104f/y5104f00.htm#Contents>.
184. Zehner MM, Farnsworth RJ, Appleman RD, Larntz K, Springer JA. Growth of Environmental Mastitis Pathogens in Various Bedding Materials^{1, 2}. *Journal of Dairy Science*. 1986;69(7):1932-41.
185. Bergeron L, Côté G, Labrecque O, Paradis M-  . Surveillance, Prévention et Contrôle des Infections    Salmonella Dublin dans les élevages de Bovins Laitiers Québec: Gouvernement du Québec, Association des Médecins Vétérinaires Praticiens du Québec,; 2015 [updated December 8, 2015]. Available from: https://www.agrireseau.net/documents/Document_91954.pdf.
186. Pasma T. Santé animale - Listeriose Ontario: Ministère de l'agriculture, de l'alimentation et des affaires rurales; 2013 [updated September 25,2020. Available from: <http://www.omafra.gov.on.ca/french/livestock/vet/facts/13-012.htm>.

187. Little CL, Pires SM, Gillespie IA, Grant K, Nichols GL. Attribution of Human *Listeria monocytogenes* Infections in England and Wales to Ready-to-Eat Food Sources Placed on the Market: Adaptation of the Hald Salmonella Source Attribution Model. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2010;7(7):749-56.
188. Filipello V, Mughini-Gras L, Gallina S, Vitale N, Mannelli A, Pontello M, et al. Attribution of *Listeria monocytogenes* human infections to food and animal sources in Northern Italy. *Food Microbiology*. 2020;89:103433.
189. Jackson KA, Gould LH, Hunter JC, Kucerova Z, Jackson B. Listeriosis Outbreaks Associated with Soft Cheeses, United States, 1998-2014(1). *Emerg Infect Dis*. 2018;24(6):1116-8.
190. Pires SM, Vigre H, Makela P, Hald T. Using Outbreak Data for Source Attribution of Human Salmonellosis and Campylobacteriosis in Europe. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2010;7(11):1351-61.
191. Pires SM, Vieira AR, Hald T, Cole D. Source Attribution of Human Salmonellosis: An Overview of Methods and Estimates. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2014;11(9):667-76.
192. Mughini-Gras L, Barrucci F, Smid JH, Graziani C, Luzzi I, Ricci A, et al. Attribution of human *Salmonella* infections to animal and food sources in Italy (2002–2010): adaptations of the Dutch and modified Hald source attribution models. *Epidemiology and Infection*. 2014;142(5):1070-82.